

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

CpA

## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類7</b> C07C 59/92, 69/738, 403/20, 403/24, C07D 213/79, 213/80, 307/32, 307/58, A61K 31/12, 31/122, 31/192, 31/216, 31/341, 31/455, A61P 3/10, 9/10, 9/12, 35/00, 37/00, 37/06, C07K 14/765	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO00/53563</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 2000年9月14日(14.09.00)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP00/01497  <b>(22) 国際出願日</b> 2000年3月13日(13.03.00)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平11/106996 1999年3月11日(11.03.99) JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 株式会社 核内受容体研究所 (NUCLEAR RECEPTOR RESEARCH LIMITED)[JP/JP] 〒213-0033 神奈川県川崎市高津区下作延1877番地26 Kanagawa, (JP) 財団法人 産業創造研究所 (INSTITUTE OF RESEARCH AND INNOVATION)[JP/JP] 〒113-0034 東京都文京区湯島1丁目6番8号 Tokyo, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 田村學造(TAMURA, Gakuzo)[JP/JP] 〒143-0023 東京都大田区山王2丁目17番12号 Tokyo, (JP) 安藤邦雄(ANDO, Kunio)[JP/JP] 〒213-0033 神奈川県川崎市高津区下作延1877番地26 Kanagawa, (JP)	<b>馬替純二(MAGAE, Junji)[JP/JP]</b> 〒302-0034 茨城県取手市戸頭4-8-7-108 Ibaraki, (JP) <b>(74) 代理人</b> 社本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo, (JP)  <b>(81) 指定国</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)  添付公開書類 国際調査報告書	
<b>(54)Title: NOVEL LIGANDS OF NUCLEAR RECEPTORS PPAR'S</b>  <b>(54)発明の名称</b> 核内リセプターPPARの新規リガンド  <b>(57) Abstract</b> Ligands of nuclear receptors PPAR's (peroxisome proliferator-activated receptors) which are compounds selected from the group consisting of ascofuranone; and ascofuranone homologs and ascochlorin homologs having at least an oracyl aldehyde moiety wherein the hydrogen atom(s) of the hydroxyl group(s) at the 2-position and/or the 4-position of the oracyl aldehyde moiety are substituted by C <sub>1-15</sub> alkyl, C <sub>1-15</sub> alkenyl, CH <sub>2</sub> COOH, CH <sub>2</sub> COO(C <sub>1-15</sub> alkyl), C(C=O)(C <sub>1-15</sub> alkyl), C(=O)(CH <sub>2</sub> ) <sub>1-15</sub> COOH, nicotinoyl, isonicotinoyl, etc. These ligands are usable in preventing and/or treating diabetes; hypertension or cerebrovascular disorders; arteriosclerosis; complications of diabetes; chronic inflammation; cachexia; digestive cancers, etc.		

BEST AVAILABLE COPY

## (57)要約

アスコフラノン(Ascofuranone)；並びにアスコフラノン同族体又はアスコクロリン(Ascochlorin)同族体であって、少なくともオルシルアルデヒド部分を有し、該オルシルアルデヒド部分の2位及び／又は4位の水酸基の水素が、 $C_{1-15}$ アルキル若しくはアルケニル、 $CH_2COOH$ 、 $CH_2COOC_{1-15}$ アルキル、 $C(=O)C_{1-15}$ アルキル、 $C(=O)(CH_2)_{1-15}COOH$ 、ニコチノイル、イソニコチノイル等からなる群より選択される基により置換されている前記同族体；からなる群より選択される化合物である、核内リセプターPPAR（パーオキシソーム増殖剤応答性受容体(peroxisome proliferator-activated receptors)）のリガンドを提供する。

本発明のリガンドは、糖尿病；高血圧症又は脳血管障害；動脈硬化症；糖尿病合併症；慢性炎症；悪液質；消化器系のガン等の予防及び／又は治療のために、使用することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明 細 書

## 核内リセプターPPARの新規リガンド

## 5 技術分野

本発明は、核内リセプターPPARのリガンド及びPPARリセプターのリガンド依存性に遺伝子の発現を制御することにより改善される疾患の治療及び／又は予防に関する。

## 10 背景技術

本発明は医療用医薬品を産業上の利用分野とし、ヒトを含む動物の代謝性疾患、慢性炎症並びに悪性腫瘍を治療する医薬品の候補化合物を包含する。ステロイド、レチノイド、活性ビタミン D3 及び甲状腺ホルモンなどは、超微量で動物に対し顕著な生理活性を示す。これらは水に溶解せず有機溶媒に溶解するので、一括して脂溶性ホルモンと呼ばれている。脂溶性ホルモンが超微量で特異的な作用を発現するメカニズムの研究が進むにつれ、その作用機作には共通性があることがわかってきた。これらの脂溶性ホルモンは細胞質に存在するリセプターと結合した後に遺伝子の特定部位に結合し、遺伝子の情報発現を直接コントロールすることにより生理作用を発揮するのである。核内リセプターをコードする DNA の分析から、核内リセプターの構造に驚くべき相同性があることが明らかにされた。これらの脂溶性ホルモンが動物細胞にはたらきかけるためには、細胞膜を透過し細胞質に存在する核内リセプターに結合する必要がある。ホルモンと結合した核内リセプターは核膜を通過して核内に移行し、二つのリセプター同士が結合した二量体（ダイマー）となって染色体のホルモン認識部位に結合し、遺伝子の情報発現をコントロールするのである。

脂溶性ホルモンと結合した核内リセプターが遺伝子の情報発現をコントロールするためには、二つのリセプター同士が結合してダイマーを形成する必要がある。ダイマーにも同じリセプター同士が結合するホモダイマーと、異なるリセプター間で結合するヘテロダイマーの場合とがある。性ホルモン、副腎皮質ホルモンな

どのステロイドは、同じリセプター同士が結合したホモダイマーとして作用する。一方、多くの脂溶性ホルモンは、ヘテロダイマーとして作用を発揮する。ヘテロダイマーを形成するリセプターの場合、対となりうるリセプターは何でもよいわけではない。ほとんどがレチノイド X リセプター(RXR)と呼ばれる核内リセプターとヘテロダイマーを形成し、染色体の認識部位に結合するのである。これらの脂溶性ホルモンのリセプターが作用を発揮するに当たり、なぜレチノイド X リセプターと結合しなければならないのか、その理由はまだよくわかっていない。

一方、多くの製薬会社が心臓の冠動脈硬化症（冠動脈硬化）治療及び／又は予防薬の研究開発を行ってきた。先進国で死亡原因の一位を占める心臓冠動脈の硬化性病変は、血液中に低比重リポ蛋白質(LDL)が過剰に存在する高 LDL 血症を最も危険な発症因子としている。LDL は多量のコレステロールを含んでいるので、高 LDL 血症は高コレステロール血症とも言い換えることができる。冠動脈硬化を治療及び／又は予防するため、高 LDL 血症を治療する血清脂質低下剤が多年にわたって探し求められてきた。1960 年代、最初に血清脂質低下剤として登場したのが、クロフィブレートと呼ばれる薬物である。クロフィブレートは、作用機作も明確でないままに、冠動脈硬化症の患者だけでなく脳動脈硬化症、大腿動脈の硬化症である間歇性跛行、あるいは冠動脈硬化のリスクが高いⅡ型糖尿病の患者などに多量に使われ、一時的に大きな商業的成功を収めた。しかし、二つの欠陥があったため次第に使用されなくなった。一つは作用特性が血清総コレステロールを低下させると云うよりは、血清中性脂肪を多量に含む超低比重リポ蛋白質(VLDL)を低下させる点にあったこと、第二に多数の冠動脈硬化症患者が参加する幾つかの二重盲検試験の結果、クロフィブレートは偽薬より心筋梗塞死が多発したり、偽薬群とのあいだに差異がなかったり、副作用が多発したりで、薬効が必ずしも明確でなかったためである。一方、クロフィブレートを患者に投与した臨床家側からは、薬物の作用機作にかかわる重要な情報がもたらされていたのである。

Ⅱ型糖尿病患者は血管障害を起こす確率が健常者と比べ十倍ほど高く、平均寿命も約十年短命とされている。したがって、血管障害を予防するため、多数のⅡ型糖尿病患者がクロフィブレートを投与された。ところが、血糖降下剤であるス

ルフォニル尿素系薬物とクロフィブレートを用いたⅡ型糖尿病患者の中に、低血糖昏睡を起こす患者が高い頻度で出現したのである。本来、高血糖状態が持続するⅡ型糖尿病患者に低血糖昏睡は起こらないはずである。昏睡を起こした症例をしらべてみると、スルフォニル尿素剤により刺激された膵臓ランゲルハンス島

5  $\beta$ 細胞が多量のインスリンを放出する一方で、クロフィブレートが末梢組織のインスリン抵抗性を軽減したため、双方が相乗的に働いて血糖が急速に低下したことが判明した。つまり、クロフィブレート及びその誘導体は末梢組織におけるインスリン抵抗性の軽減効果を期待できることが以前からわかっていたのである。

1982年には本発明者はアスコクロリン誘導体、AS-6が正常及びストレプトゾ

10 トシン投与の齧歯類動物において、血糖及びインスリンを低下させることを発表した (Agr. Biol. Chem. 46: 2865-69, 1982)。1980年代後半に入ると、幾つかの製薬会社がⅡ型糖尿病の特徴であるインスリン抵抗性を改善する薬物の研究開発に着手するようになった。候補化合物をデザインする上でモデル化合物となったのは、末梢組織のインスリン感受性を増強するクロフィブレート（アリロキシ系

15 化合物）と血糖降下作用があるチアゾリジンを一つの化合物に統合した武田薬品のシグリタゾンであった。この化合物は効力が不足して開発に失敗したが、その後のチアゾリジンジエンジオン系化合物(TZD)のモデル化合物となった点で高く評価される。引き続いてトログリタゾン、ピオグリタゾン、ロジグリタゾンなどの TZD 系薬物が開発され、Ⅱ型糖尿病の治療はインスリン抵抗性解除を主要な

20 薬効とする TZD の出現により転機を迎えた。TZD の作用機作は当初全く不明であったが、クロフィブレートの研究が端緒になって作用機作が解明されたのである。リガンド不明な核内リセプター（オーファン・リセプター）PPAR $\alpha$ が、クロフィブレートによって活性化されるところから、TZD も PPAR のリガンドとして遺伝子情報の発現を制御している可能性が示唆されたのである。PPAR とはク

25 ロフィブレートが肝臓のパーオキシソームを増殖させ、肝臓の肥大化を誘発することにちなんだ名称で、パーオキシソーム増殖剤応答性リセプター（peroxisome proliferator-activated receptors）と呼ばれるリセプター群である。クロフィブレートと部分的に共通の化学構造を有する TZD などについても、当然のことながら PPAR リセプターとの相互作用について検討が行われたのである。その結果、

TZD の標的細胞は白色脂肪細胞であり、TZD は白色脂肪細胞に多量に発現する核内リセプターPPAR $\gamma$ を活性化するリガンドであることが明らかにされた。この発見はⅡ型糖尿病の成因に関する仮説の修正を迫るものであった。それまでは、白色脂肪組織は脂肪を貯蔵するサイレントな組織であって、Ⅱ型糖尿病患者のインスリン感受性低下は肝臓ないしは筋肉におけるインスリン抵抗性発現に原因があると考えられていたのである。

それ以降、白色脂肪組織は、いわゆる生活習慣病と呼ばれる多くの疾患の予防、治療のターゲット臓器と考えられるようになり、脂肪細胞の分化とその調節機構について、分子レベルでの知見が多数集積してきた。現在では PPAR $\gamma$ が白色脂肪組織、リンパ系組織、副腎及び腸管に顕著に発現していることがわかっている。脂肪組織の場合には、PPAR $\gamma$ の補助因子(CBP 及び類似分子)との共役のもとに、脂肪細胞の分化に重要な役割を果たすこと、さらにリノール酸やアラキドン酸などの食事性脂肪酸が PPAR ファミリーのリガンドであることが明らかにされ、食事療法や薬物療法の標的として PPAR ファミリーの重要性が増してきている。

PPAR-CBP を中心とする脂肪細胞分化の分子機構を解明することにより、脂肪組織におけるエネルギー代謝調節機構の一端が明らかとなり、肥満をベースとした生活習慣病に対する新たな治療、創薬の標的が見出されることが大いに期待されている。PPAR には三種類あり、PPAR $\alpha$ は主として肝細胞に分布し、PPAR $\beta$ は全身に、PPAR $\gamma$ は脂肪細胞、副腎、リンパ系組織及び腸管に分布する。過食のため中性脂肪を多量に貯蔵し肥大化した脂肪細胞は、アディポサイトカインと総称される一群のサイトカインを産生し循環血中に放出する。このアディポサイトカインが末梢組織のインスリン感受性を低下させることが次第に明確になってきたのである。アディポサイトカインの中には TNF- $\alpha$ が含まれていることは注目に値しよう。TNF- $\alpha$ は動物に投与すると、末梢組織におけるグルコースの取り込みを強く抑制し、末期ガン患者の悪液質を惹起することがわかっているからである。

一方、リンパ系組織に発現する PPAR $\gamma$ については、脂肪組織以外にも、脾臓、腸管及び副腎で多量に発現していることが知られていて、これらの臓器に発現している PPAR $\gamma$ の役割についても研究が進んできた。中でもリンパ系細胞に発現

する PPAR $\gamma$  の役割について、1998 年、注目すべき論文が二つ発表されている(M. Ricote et. al., NATURE 391: 79-82, 1998 ; C. Jiang, A. T. Ting and B. Seed. NATURE 391: 82-86, 1998)。これらは、慢性炎症と PPAR $\gamma$  の関連に焦点を当てた研究である。炎症局所に浸潤した活性化マクロファージは、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 のような炎症性サイトカインを活発に生合成して炎症を慢性化させる。

5 上記の論文は、活性化マクロファージの培養液に PPAR $\gamma$  のリガンドである非ステロイド系鎮痛消炎剤を加えると、炎症性サイトカイン産生に関連する遺伝子の転写が用量依存性に抑制されること、及び非ステロイド系鎮痛消炎剤は、転写促進因子 AP-1, STAT 及び NF- $\kappa$ B と部分的に競合することにより、炎症性サイト

10 カイン遺伝子の発現を抑制することを明らかにした。従って、非ステロイド系鎮痛消炎剤は、核内リセプター PPAR $\gamma$  を活性化することにより IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  および IL-6 などの炎症性サイトカイン遺伝子がメッセンジャー RNA に転写されるのを抑制し、その結果として炎症性サイトカインの生合成を抑制する。現行の TZD 系化合物は、活性化マクロファージの炎症性サイトカイン産生をほとんど抑制し

15 ないので、慢性炎症治療への応用は考えられない。しかし、PPAR $\gamma$  リガンドによる炎症性サイトカインの産生抑制は、PPAR が多量に発現している動脈硬化の病巣、糖尿病性合併症、慢性関節リウマチに代表される慢性炎症及び悪性腫瘍の治療に結びつく可能性を秘めている。

非ステロイド系鎮痛消炎剤の作用機作は、急性に炎症局所に痛みと腫脹をもたらすプロスタグランジンの産生抑制にある。しかし、炎症が慢性化する過程では、

20 プロスタグランジン産生と並んで TNF $\alpha$  などの炎症性サイトカイン放出が大きな役割を果たしていることは、TNF $\alpha$  あるいは IL-6 リセプターに対するモノクローナル抗体を全身投与すると、慢性関節リウマチ等の慢性炎症を改善させることから明らかである。急性炎症の治療に使われる非ステロイド系鎮痛消炎剤は、

25 長期連用が難しい。消化管粘膜におけるプロスタグランジン生合成を抑制し、高率に消化性潰瘍を発症させるからである。慢性炎症治療のためには、炎症性サイトカイン産生を抑制するが、プロスタグランジン生合成を阻害しない薬物の開発が要望されている。最近、心臓の冠動脈硬化症は、慢性肝炎、糸球体腎炎、慢性膵炎、慢性関節リウマチなどと並んで典型的な慢性炎症であると主張するロス

の学説(R. Ross, New Eng. J. Medicine 340: 115-126, 1999 年)が広く承認されるようになった。つまり活性化マクロファージによる炎症性サイトカイン産生を抑制する治療法は、冠動脈硬化症、慢性肝炎、糸球体腎炎、慢性膵炎及び慢性関節リウマチ等の慢性炎症が関与する難病を治療可能にする潜在力を持っている。

- 5 ある種の悪性腫瘍は多量の TNF を産生し、患者に悪液質と呼ばれる代謝性の荒廃状態を惹起する。この状態に陥った患者は、摂取するエネルギーを同化することができず、エネルギーバランスが負に転化し急速に衰弱してゆく。それとともに、免疫能も低下するので、日和見感染菌が増殖し、敗血症を起こして死亡することが多い。ガン患者の 7 割は、ガンで死亡するのではなく、日和見感染菌による敗血症で死亡するのである。従って、悪性腫瘍の TNF $\alpha$  産生を制御することは、担ガン患者の延命にとって必須である。興味あることに、大腸ガンの細胞は多量の PPAR $\gamma$  を発現しているが、TNF $\alpha$  産生はまったく制御されていない。つまり、大腸ガンの細胞に発現した PPAR は、リガンドにより活性化されないので TNF $\alpha$  の産生を制御できないのである。その証拠には、大腸ガン患者に PPAR $\gamma$
- 10 のリガンドであるサリシダックを与えると、TNF $\alpha$  の産生を抑制し一時的に寛快状態を導入できる。もちろん、サリシダックは非ステロイド系鎮痛消炎剤であるから、プロスタグランジンの生合成を抑制するため長期に投与することは難しい。この事実は細胞内における核内リセプターが多量に発現するだけでは不十分で、核内リセプターが遺伝情報の転写を制御するには必要にして十分な量の特異的リ
- 15 ガンドが外部から供給される必要があることを物語っている。つまり、消化器ガン患者の治療及び延命にとって、PPAR $\gamma$  リガンドは大きな役割を果たす可能性がある。

- 慢性関節リウマチを代表とする慢性炎症の治療に用いられる薬剤は、急性炎症の治療に用いられる非ステロイド系鎮痛消炎剤あるいは糖コルチコイドが転用
- 25 されているだけで、慢性炎症に対する特異的な治療薬はまだ存在しないと云ってもよい。非ステロイド系鎮痛消炎剤は、プロスタグランジン生合成を阻害するため、連用すると消化性潰瘍など消化器系への副作用が頻発する欠点がある。一方、糖コルチコイドも、プロスタグランジン生合成の阻害、免疫抑制による感染症の多発、糖尿病など代謝異常の誘発、投薬を中止すると投薬前よりかえって症状が



- 悪化するリバウンド現象など、たくさんの副作用を抱えている。これらの薬物に依存する現行の慢性炎症治療法は、患者の生活の質(Quality of Life; QOL)を顕著に改善しているとは言い難い。さらに注目すべきは細小血管の炎症を背景として発症する糖尿病性合併症である。糖尿病性合併症も慢性の血管炎症が基になって
- 5 発症するので、慢性炎症に対し特異的に改善効果を発揮する薬物が開発されれば予防／治療できる可能性が大きい。慢性関節リウマチ、動脈硬化、糖尿病性細小血管症、結節性動脈周囲炎及び動脈瘤などの慢性血管炎症に対する治療は、副作用頻発による QOL 低下なしに慢性炎症を治療することが出来る薬物の出現が望まれる。今後、慢性炎症に対する消炎剤として PPAR $\gamma$  のリガンドが活発な研究
- 10 の対象として浮上することが予測されている。

- PPAR $\gamma$  とヘテロダイマーを形成し、遺伝子情報の発現を制御している核内リセプターRXR のリガンドが、Ⅱ型糖尿病の代謝異常に対しどのような作用を示すかは注目の的であった。この問題に示唆を与える最初の研究が、1997 年に発表された。(Nature 386: 407-410, 1997 年)。この研究は前骨髄性白血病、カポジ肉
- 15 腫などの治療薬として開発中のレチノイド誘導体 LG100268 及び LGD1069 が、細胞培養及び動物実験において、(1)細胞培養で遺伝子情報の発現を制御すること、(2)遺伝性肥満糖尿病マウス ob/ob 及び db/db に経口投与すると、インスリン感受性を増強し、血糖、血清中性脂肪及び血清インスリンを劇的に低下させること、(3)それぞれ単独では薬効が発現しない少量レチノイド誘導体と TZD を
- 20 併用投与すると RXR のリガンドと PPAR $\gamma$  のリガンドは in vivo 及び in vitro で相乗作用を示すと報告している。しかし、同一の化合物が RXR 及び PPAR 両リセプターのリガンドとして働く可能性については、これまで言及されたことも、発表されたこともなかった。

## 25 発明の概要

発明者は、代謝性疾患及び慢性炎症の治療及び／予防に有効な手段を見出すために研究し、アスコクロリン、その類縁化合物、並びにそれらの誘導体からなる群から選ばれたレチノイドXリセプターに結合するリガンドを先に特許出願した(特願平10-377905号、及び国際出願PCT/JP/07012)。

本発明者はさらに検討を進めたところ、アスコクロリン及びアスコフラノン、その誘導体が PPAR $\gamma$  リセプターに結合し遺伝子の発現を制御することを発見するとともに、先の特許出願に包含される RXR のリガンドであるアスコクロリンの 2 位及び／または 4 位の水酸基を置換基により置換した誘導体が、PPAR $\gamma$  リセプターにも結合し遺伝子の発現を制御することを発見した。このような化合物が同時に二つの核内リセプターのリガンドとして作用することは、従来、まったく知られていない新しい知見である。

即ち、本発明は、アスコフラノン、アスコフラノン同族体又はアスコクロリン同族体である、核内リセプター PPAR のリガンドを提供する。これらは、哺乳動物における核内リセプター PPAR リガンド依存性の遺伝情報の転写の制御により改善される疾患又は状態の治療及び／又は予防のため、より詳細にはインスリン抵抗性発現による II 型糖尿病を含む糖尿病；高血圧症又は脳血管障害；心臓冠状動脈硬化症を含む動脈硬化症；糖尿病合併症；血管、肝臓、腎臓、関節、腸管及び膵臓を含む臓器の慢性炎症、並びに自己免疫疾患に関連する慢性炎症を含む慢性炎症；末期ガン患者に起こる悪液質；大腸ガン、胃ガン、及び肝臓ガンを含む消化器系のガンの治療及び／又は予防のため、並びに哺乳動物における膵臓ランゲルハンス島  $\beta$  細胞が変性及び／又は壊死するのを阻止するために、使用することができる。

## 20 図面の簡単な説明

図 1 は、化合物-17 による遺伝性肥満糖尿病マウス(db/db マウス)の多飲多尿の改善と尿糖排泄抑制効果を表す。

図 2 は、化合物-25 による db/db マウスの血糖値と尿糖排泄の変動を表す。実験開始の二日前に 12 週令の db/db マウス、10 頭の尾静脈から採血し、一群の平均血糖値が 720-740 mg/dl になるように二群に分けた。一群を対照群、他の一群を化合物-25 投与群とし、化合物-25 は 60 mg/kg を一日一回経口投与した。◆：対照群、●：化合物-25 投与群。\*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ , in Student t-test.

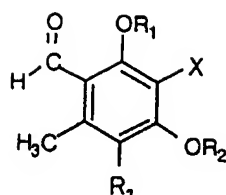
図 3 は、化合物-1 と化合物-25 による NOD マウスの I 型糖尿病発症予防効果を表す。◆：対照群、▲：化合物-1 の 25mg/kg 群、□：化合物-1 の 50mg/kg 群、

×：化合物-25 の 50mg/kg 群。それぞれ一群は 10 頭から構成されている。24 週目における I 型糖尿病の発症率は、対照群 70%、化合物-1 の 25mg/kg 群が 30%、化合物-1 及び-25 の 50mg/kg 群が 10%で、後二者と対照群との間には出現率の検定で 5%の有意差がある。

- 5 図 4 は、表面プラズモン共鳴センサーによる化合物-27 とピオグリタゾンの結合試験の結果を表す。ピオグリタゾンは結合しないのでシグナルが発生しないが、化合物-27 は明らかにシグナルが発生する。

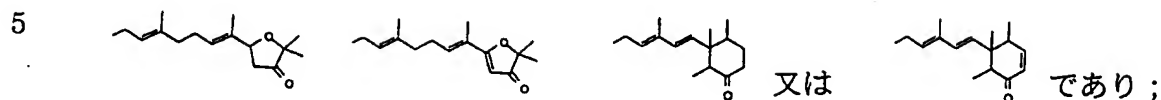
### 発明の開示

- 10 本発明は、アスコフラノン；並びにアスコフラノン同族体又はアスコクロリン同族体であって、少なくともオルシルアルデヒド部分を有し、該オルシルアルデヒド部分の 2 位及び／又は 4 位の水酸基の水素が、 $-(C_1 \sim C_{15})$  アルキル若しくはアルケニル、アリール、 $(C_1 \sim C_{15})$  アルキルアリール、 $-CH_2COOH$ 、 $-CH_2COO(C_1 \sim C_{15})$  アルキル、 $-C(=O)(C_1 \sim C_{15})$  アルキル、 $-C(=O)$  アリール、 $-C(=O)(C_1 \sim C_{15})$  アルキルアリール、 $-C(=O)(CH_2)_{1 \sim 15}COOH$ 、ニコチノイル又はイソニコチノイルからなる群より選択される基により置換されている前記同族体；からなる群より選択される化合物である、核内リセプター PPAR のリガンドを提供する。本明細書で「アスコフラノン同族体」というときは、特別な場合を除き、アスコフラノンと類似の構造を有する化合物をいい、少なくともオルシルアルデヒド部分を有し、オルシルアルデヒド部分の 3 位置には適当な側鎖（例えば、テルペノイド）を有し、5 位置はアスコフラノンと同様 C 1 であってもよく、H であってもよく、かつ核内リセプター PPAR に結合することができるものをいい、デヒドロアスコクロリンも含まれる。本明細書で「アスコクロリン同族体」というときは、特別な場合を除き、アスコクロリンと類似の構造を有する化合物をいい、少なくともオルシルアルデヒド部分を有し、オルシルアルデヒド部分の 3 位置には適当な側鎖（例えば、テルペノイド）を有し、5 位置はアスコクロリンと同様 C 1 であってもよく、H であってもよく（このときアスコクロリン類縁化合物ということもある）、かつ核内リセプター PPAR に結合することができるものいう。本発明はまた、式：
- 20
- 25



[式中、

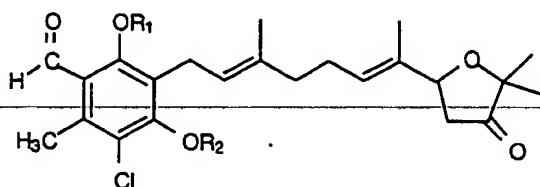
Xは、



$R^1$ は、H、 $-(C_1 \sim C_5)$  アルキル又はアルケニル、又は $-C(=O)$  ( $C_1 \sim C_5$ ) アルキルであり； $R^2$ は、H、 $-(C_1 \sim C_5)$  アルキル又はアルケニル、 $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{COO}$  ( $C_1 \sim C_5$ ) アルキル、 $-C(=O)$  ( $C_1 \sim C_5$ ) アルキル、 $-\text{C}(=O)$  ( $\text{CH}_2$ ) $_{1 \sim 5}\text{COOH}$ 、ニコチノイル又はイソニコチノイルであり；及び $R^3$ は、H又はClである（但し、アスコクロリンを除く）] で表される化合物である、核内リセプターPPAR のリガンドを提供する。

本発明の PPAR のリガンドは、以下を含む。

アスコフラノン及びその誘導体、即ち、式 (1)：



15

表 1. アスコフラノン及びその誘導体

化合物 #	$R_1$	$R_2$	備 考
1	H	H	アスコフラノン(AF)
2	H	$-\text{COCH}_3$	4-O-アセチル誘導体
3	H	$-\text{CH}_3$	4-O-メチル AF
4	$-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$	2,4-ジメチル AF
5	$-\text{COCH}_3$	$-\text{CH}_3$	4-O-メチル、2-O-アセチル AF
6	$-\text{CH}_3$	$-\text{COCH}_3$	2-O-メチル、4-O-アセチル AF
7	$-\text{CH}_3$	H	2-O-メチル AF 新規化合物
8	H	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	4-O-エチル AF
9	H	-allyl	4-O-アリル AF
10	H	-butyl	4-O-ブチル AF
11	H	$-\text{CH}_2\text{COOH}$	
12	H	$-\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	
13	H	-nicotinoyl	
14	H	-iso-nicotinoyl	新規化合物
15	H	$-\text{CO}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	新規化合物

アスコクロリン及びその誘導体、即ち式（２）：

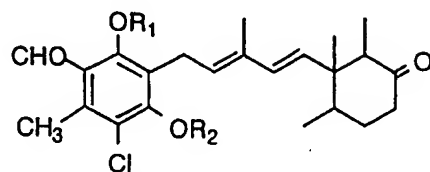


表 2

化合物 #	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	備 考
16	H	H	Aascochlorin (AS)
17	H	-CH <sub>3</sub>	4-O-MeAS
18	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	2,4-diMeAS
19	-COCH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	
20	-CH <sub>3</sub>	-COCH <sub>3</sub>	
21	-CH <sub>3</sub>	H	
22	H	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	
23	H	-Allyl	
24	H	-butyl	
25	H	-CH <sub>2</sub> COOH	
26	H	-nicotinoyl	
27	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> COOH	新規化合物
28	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	新規化合物
29	H	-CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	新規化合物
30	H	-iso-nicotinoyl	新規化合物
31	-CH <sub>3</sub>	-iso-nicotinoyl	新規化合物

5

アスコクロリン類縁化合物、即ち式（３）：

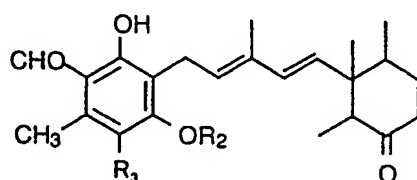
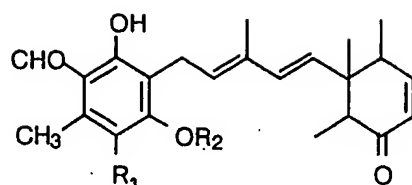


表 3 アスコクロリン類縁化合物

化合物 #	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
32	H	H
33	-CH <sub>3</sub>	H
34	-COCH <sub>3</sub>	H

10

及び、式（４）：

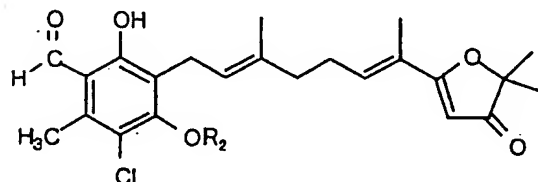


5

表４．アスコクロリン類縁化合物

化合物 #	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
35	H	H
36	-CH <sub>3</sub>	Cl
37	-COCH <sub>3</sub>	Cl
38	-CH <sub>3</sub>	H
39	-COCH <sub>3</sub>	H

並びに、デヒドロアスコクロリン及びその誘導体、即ち式（５）：



- 10 式（５）中、オルシルアルデヒド 2 位置の水酸基の H は、 $-(C_1 \sim C_5)$  アルキル又はアルケニル、又は  $-C(=O)(C_1 \sim C_5)$  アルキルで置換されていてもよく； $R_2$  は、H、 $-(C_1 \sim C_5)$  アルキル又はアルケニル、 $-CH_2COOH$ 、 $-CH_2COO(C_1 \sim C_5)$  アルキル、 $-C(=O)(C_1 \sim C_5)$  アルキル、 $-C(=O)(CH_2)_{1 \sim 5}COOH$ 、ニコチノイル又はイソニコチノイルであり；
- 15 及び 5 位置の Cl は、H でもよい。このような化合物は新規な化合物である。

本発明の化合物における化学構造上の特徴は、このようにオルシルアルデヒド基にテルペノイド側鎖が結合する構造を持っていることである。生物学的な特徴は、PPAR リセプター結合部位を連結した移入遺伝子を哺乳動物細胞内で用量依存性に発現させる点にある。

20

### 製造方法

本発明の化合物は、糸状菌 *Ascochyta viciae* などを培養することにより產生される代謝産物アスコクロリン、アスコフラノン及びそれらの類縁物質、さらに、

それらを有機化学的に修飾した誘導体到大別される。アスコフラノンは発明者の一人が 1972 年に報告した糸状菌 *Ascochyta viciae* が産生する抗生物質 (Tetrahedron Letters No. 25, 2541-2544) で、本菌はアスコフラノンと同時にアスコクロリンをも産生する。一方、アスコクロリンは *Ascochyta viciae* 以外

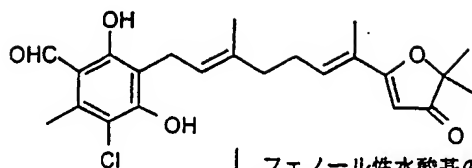
5 にも *Nectria coccinea*, *Fusarium* sp., *Cylindocarpon lucidium*, *Cylindrocladium ilicicola*, *Cylindrocladium* sp., *Verticillium* sp. 等の糸状菌が産生することが報告されているが、アスコフラノンがこれらの糸状菌から単離されたという報告はない。アスコフラノンは *Ascochyta viciae* に特異的な代謝産物である。

デヒドロアスコフラノンは、アスコフラノンを出発物質として、そのテトラハ

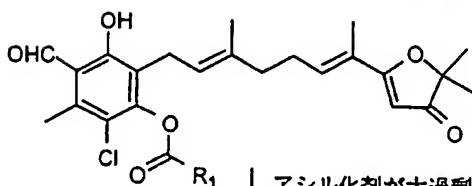
10 イドロフラン環から、定法に従って脱水素反応を行うことにより、合成することができる。また、アシル化、アルキル化されたデヒドロアスコクロリンは、次の方法によって合成することができる。なお、この方法はアスコクロリン及びアスコフラノン、並びにそれらの誘導体のアシル化、アルキル化のためにも用いることができる。

15 なお、本明細書でいうアリールとは、芳香族炭化水素から水素原子 1 個を除いた残りの原子団をいい、フェニル、トリル、キシリル、ビフェニル、ナフチル、アントリル、フェナントリル、及びこれらが 1～3 個の置換基によって置換されたものを含む。該置換基は ( $C_1 \sim C_5$ ) アルキル若しくはアルケニル、クロルを含むハロ、又はニトロを含む。

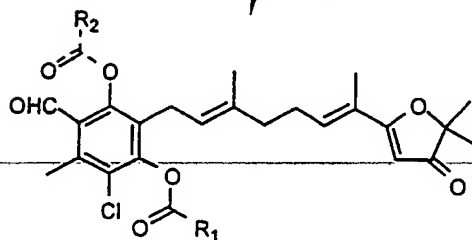
## アシル化



フェノール性水酸基のアシル化は、アセチルクロライドの様な塩化アシル、或いは無水酢酸のようなアシル化剤とピリジンの様な塩基性溶媒中で反応させると容易に起こる。アルキル置換と同様に4位の水酸基が優先的にアシル基によって置換される。

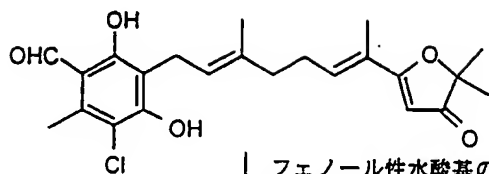


アシル化剤が大過剰に存在すると、アルキル化の場合と同様に2位の水酸基もアシル化される。しかし、アルキル化の場合と異なりジアシル誘導体は結晶性がない。油状物であるジアシル誘導体を精製するため、シリカゲルのカラムクロマトグラフィーを行うと、2位のアシル基は分解して水酸基に戻ってしまう。

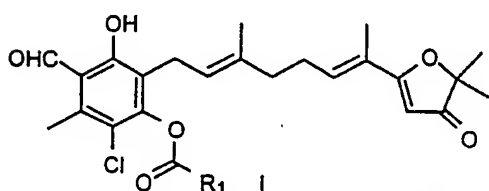




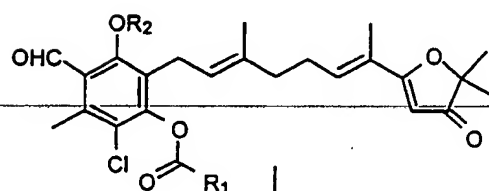
# アルキル化



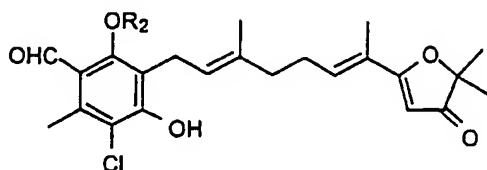
フェノール性水酸基のアシル化は、アセチルクロライドの様な塩化アシル、  
或いは無水酢酸のようなアシル化剤とピリジンの様な塩基性溶媒中で反応  
させると容易に起こる。アルキル置換と同様に4位の水酸基が優先的に  
アシル基によって置換される。



アルキル化剤により2位の水酸基をアルキル化する。2位の水酸基は  
核リセプターPPAR $\gamma$ とリガンドとの結合を邪魔することが分かっているので、  
アルキル化により活性化作用が強い誘導体とすることができる。

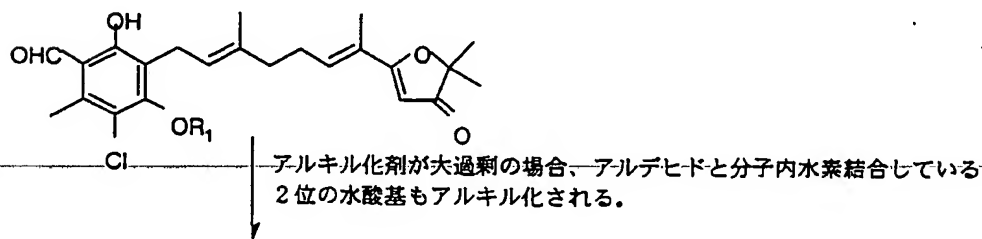
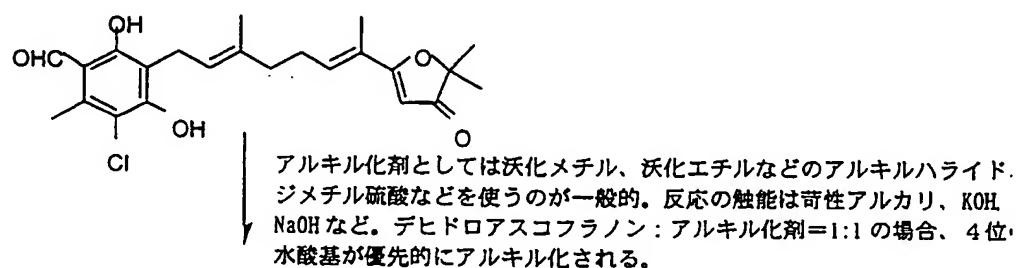


加水分解



## 2-O-アルキルデヒドロアスコフラノン誘導体

- アスコクロリン及びアスコフラノン誘導体が結合した PPAR $\gamma$ リセプターの X 線回折による検討から、オルシルアルデヒド 2 位の水酸基は、リセプター蛋白と
- 5 リガンドとの相互作用を弱める方向に働いていることが分かった。従って、2 位の水酸基をアルキル化した 2-O-methyl 誘導体は母化合物より PPAR $\gamma$ リセプターを強く活性化する。2 位の水酸基をアルキル基に置換する方法は次のとおり。



置換して結晶化が可能なアルキル基としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、アリル基など。

## 作用

本発明者はアスコフラノンを経口投与すると、きわめて毒性が弱く、しかも標準飼料及び高脂肪飼料のいずれで飼育した場合でも、ラットの血清脂質を低下させる作用を示すことを報告した (J. Antibiotics 24:お 681-686, 1973 及び Jpn. J. Pharmacol. 25: 35-39, 1975)。さらに本発明者らは、高血圧症のモデルである DOCA 高血圧ラットにアスコフラノンを経口投与すると、血圧の上昇は抑制しないが心血管病の指標を改善させることを報告している (Eur. J. Pharmacol. 69: 429-438, 1981)。アスコフラノンがなぜこのような作用を示すのかについては、長いこと謎であった。アスコフラノンが核内リセプタースーパーファミリーに属する PPAR のリガンドとして作用し、遺伝情報の発現を制御することにより上記の作用を発揮していること発見したのはごく最近のことである。

一方、先行出願においてアスコクロリン、その類縁化合物及び誘導体が、細胞培養で RXR ないし RAR 結合部位を連結した移入遺伝子の発現を用量依存性に増大させることを見出し、それらが RXR 及び RAR リセプターのリガンドであることを証明した。それらの知見をまとめ、医薬のための用途特許を出願している。

本発明の化合物のなかでは、アスコフラノン、その類縁物質及び誘導体は、PPAR リセプターの特異的リガンドであって、レチノイド X (RXR) 及びオールトランスレチノイン酸 (RAR) リセプターを活性化しない。アスコクロリンのオルシルアルデヒド 2 位及び／又は 4 位の水酸基を置換基で修飾した化合物群は、核内リセプタースーパーファミリーに属する PPAR 及び RXR の双方を活性化し、移入遺伝子の発現を促進させる。つまり、二つのリセプターと結合するリガンドであることが大きな特徴である。つまり、本発明の化合物は先行出願とほぼ同様の薬理作用を持っている。

本発明の化合物が示す薬理効果は、次の通りである。一つは生活習慣病に対する改善効果であって、Ⅱ型糖尿病、本態性高血圧症、虚血性心疾患、高脂血症及びこれらの疾患に合併する疾患があげられる。さらに PPAR が多量に発現する悪性腫瘍とそれに随伴する症状が、本発明の化合物による治療及び予防の対象になる。具体的には PPAR が多量に発現する末期の消化器ガン及びそれに随伴する悪液質の治療に有効に使用できる。また、本発明の化合物は、各種臓器及び組織に

- における慢性炎症の治療及び予防に有用である。血管の慢性炎症である結節性動脈周囲炎（動脈瘤）、冠動脈硬化症、脳血管障害及び糖尿病の細小血管症、慢性関節リウマチなどが、その代表的な適用疾患である。しかも、本発明の化合物は、TZDのように白色脂肪組織に発現するPPAR $\gamma$ だけを活性化する特異的なリガンドではなく、広くリンパ系組織、副腎及び腸管に発現するPPAR $\gamma$ をも活性化させる点が大きな特徴である。PPARは血管平滑筋細胞に発現しているので、PPARの活性化による炎症性サイトカイン遺伝子の転写制御は、炎症性サイトカインの転写因子NF- $\kappa$ Bを減少させ、血管の慢性炎症改善が期待できる（B. Staels et al., Nature, 393: 790-795, 1998年）。つまり、本発明にかかわる化合物はアディポサイトカイン及び炎症性サイトカインの過剰産生に基づく諸疾患に有効であり、適用範囲は本特許に記載された実施例の範囲にとどまるものではない。核内リセプターPPARを同様に活性化するチアゾリジンジエンジオン系化合物(TZD系)と比べ、本発明の化合物が広範囲の薬効を示す理由は、リセプターとの結合様式に違いがあるためと思われる。すなわち、TZD系はPPAR $\gamma$ リセプターを固定化したピアコアカラムにまったく結合しないのに対し、本発明の化合物はin vitroでもPPAR $\gamma$ リセプターに結合する。

### 剤形

- 本発明の化合物を投与する場合、類似の用途に供される薬剤が許容されている任意の投与経路で純品の形または適当な医薬組成物の形で製剤化して投与することができる。従って投与は、例えば錠剤、座剤、丸剤、カプセル剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、クリーム剤、ローション剤、エアロゾール剤、軟膏剤、ゲル化剤などのような固体、半固体、凍結乾燥粉末または液体投与形態で、例えば経口、鼻腔内、非経口または局所的に、好ましくは正確な用量を1回に投与しうる適当な単位用量形態で実施することができる。この組成物は通常の製薬用担体または賦形剤および本発明の化合物からなり、さらにその他の医療用医薬品、担体および吸収補助剤などを含有してもよい。一般に製剤上許容しうる組成物は、投与しようとする剤形に応じて、本発明の化合物を約1~99（重量）%含有し、適当な医薬添加物を約99~1%含有している。この組成物は、医療用医薬品として本発

明の化合物を約 5～75%含有し、残りは適当な医薬品用賦形剤を含有している。  
本発明の化合物が病態を改善するために有効な一日あたりの投与量は、成人の体重 kg あたりで 0.1～20 mg/kg にあり、望ましくは 0.2～5 mg/kg である。

先に詳細に説明した疾患に対する好ましい投与形態は、疾患の程度に応じて調

- 5 節可能に設定した投薬量を選定できるように製剤化することである。製剤化にあたって最も重要なことは、本発明の化合物群が脂溶性であることに由来する制約である。核内リセプター・スーパーファミリーのリガンドは、脂溶性ホルモンないしビタミンであり、従って、本発明の化合物も脂溶性であることは当然である。経口投与用として製剤上許容できる添加物は、例えばマンニット、乳糖、でんぷ
- 10 ん、ステアリン酸マグネシウム、サッカリン・ナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、ゼラチン、シュクロース、炭酸マグネシウムなどのような通常使用可能な任意の賦形剤を加えて調整する。そのような組成物は、液剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤および徐放製剤などの形態をとる。組成物は錠剤または丸剤の形態が好ましいが、そのような組成物は本発明の化合物と一緒に乳糖、シューク
- 15 ロース、リン酸にカルシウムなどの希釈剤、でんぷんおよびその誘導体のような崩壊剤、ステアリン酸マグネシウムなどのような滑沢剤、およびでんぷん、アラビアゴム、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、セルロースおよびそれらの誘導体のような結合剤、さらに高度に脂溶性で親水性である本発明の化合物粒子表面を水で濡らす作用を示す界面活性剤、脂溶性の添加物、胆汁酸、リン脂質などを含
- 20 有する。脂肪族系の合成界面活性剤又は有機溶媒可溶の高分子助剤を含有することは特に好ましい。これらの例としては、例えば、アラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、ベントナイト、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリソルベート 80、ソルビタンモノ脂肪酸エステル、ステアリン酸ポリオ
- 25 キシル 40 等がある。

製剤上で特に重要なことは、本発明の化合物が物性の点で親水性であることに由来する制約である。一般に脂溶性薬物の消化管吸収は、薬物粒子から単分子が水に溶ける速度に支配される。水に溶けた脂溶性薬物は、消化管粘膜の吸収部位に到達すると、事実上バリアフリーで急速に吸収されるからである。水に難溶性

の薬物であっても、水への溶解速度が速やかであれば、経口投与により速やかに吸収され、バイオアベイラビリティが大きくなる。しかるに、本発明の化合物は、水の溶ける速度がきわめて遅いことが知られている。従って、製剤化する場合には、水への溶解速度を速めるための添加物及び製剤化工程での工夫が必要である。

- 5 本発明の化合物のように水に難溶性かつ水への溶解速度がきわめて遅い場合、水への溶解を促進するための工夫の一つは、薬物粒子直径をできるだけ小さくすること、すなわち、(1) 水と粒子が接触する表面積を広げるため微粒子化することである。しかし、単に微粒子化しても、粒子表面が親水性のため水と接触できず、微粒子として分散しなければ、水への溶解速度は大きくならない。従って、粒子
- 10 表面が水と接触できるようにするため、(2) 本発明の化合物と界面活性剤あるいは脂溶性基と水溶性基を併有する高分子を共存させる必要がある。また、(3) 薬物粒子から単分子が遊離しやすくする工夫も必須である。すなわち、薬物粒子が結晶の場合には、結晶の格子から単分子が遊離するため必要な自由エネルギーが小さい結晶形を選択すること、さらに本発明の化合物をアモルファス化して単分子が遊離しやすくする製剤化工程が必要である。これら本発明の化合物を製剤化
- 15 するため必要な条件は、すべて本発明の化合物発明の請求項に記載されるとおりである。

#### シッフ塩基

- 20 本発明の化合物は、血中では、そのアルデヒド基と血清蛋白のアミノ基とが反応して、シッフ塩基を形成することができる。本発明の化合物と血清蛋白によるシッフ塩基の形成は、消化管から吸収された遊離体の生物活性を一時的にマスクし、活性がある遊離体を徐々に標的組織に供給する緩衝作用を果たしているのである。また、このシッフ塩基は標的細胞表層に吸着しエンドサイトーシスにより
- 25 細胞内に取り込まれて加水分解を受け、遊離の化合物を再生する。遊離の化合物は貯蔵脂肪の油滴中に溶け込み、脂肪細胞内では少しずつ細胞質に溶解して作用を発揮する。さらに白色脂肪組織の貯蔵脂肪がエネルギー源として他の組織に運ばれる際には、脂肪と一緒に運搬されて行く。つまり、同時に貯蔵の役割をも担っているのである。

本発明の化合物は他の組織にはほとんど取り込まれず、貯蔵脂肪の油滴が存在しないので蓄積せず毒性も示さない。

以下、本発明の実施例をあげるが、本発明がこれらの実施例に拘束されないことは云うまでもない。

### 調製 1

#### デヒドロアスコフラノン

アスコフラノンのテトラヒドロフラン環から水素を2分子の脱水素したデヒドロアスコフラノンは次のように合成した。水酸化ナトリウム 0.16g (4.0 mmol) を脱イオン水 0.7 ml に溶解し、水浴で冷却しながら AgNO<sub>3</sub> (0.34 g, 2.00 mmol) の脱イオン水溶液(0.7 ml)を少しずつ加えた、生成した硝酸銀の水懸濁液にアスコフラノン(0.2 g, 0.476 mmol)のジオキサン溶液 (1.4 ml)を加えた。反応混合物を室温で三時間攪拌した後、水-ジオキサン混合溶媒(1:1)で希釈し、セライトで濾過した濾液を 6N-HCl で酸性としてからジクロルメタンで抽出した。ジクロルメタン層を水、飽和食塩水で洗浄した後、MgSO<sub>4</sub>で乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルII カラムクロマトグラフィーにかけ、ジクロルメタン:アセトン(60:1)により精製してデヒドロアスコフラノン 0.047 g (収率 24%) を得た。

融点 139.5-140.5℃ IR (cm<sup>-1</sup>): 1680, 1635, 1555 <sup>1</sup>H NMR (ppm): 1.35 (6H, s), 1.82 (3H, br s), 1.84 (3H, br s), 2.13 (2H, br t, J=7.2 Hz), 2.33 (2H, br q, J=7.5 Hz), 2.60 (3H, s), 3.40 (2H, d, J=7.2 Hz). 10.14 (1H, s), 12.69 (1H, s) <sup>13</sup>C NMR (ppm): 12.93, 14.44, 16.13, 22.03, 23.03 (probably two overlapping peaks), 27.05, 38.29, 88.10, 98.52, 113.14, 113.59, 114.21, 121.90, 125.76, 135.03, 137.71, 138.12, 156.17, 162.15, 184.66, 193.30, 207.20 元素分析 実測値(%) C, 65.88; H, 6.54. 計算値(%) C, 65.94; H, 6.50

### 調製 2

A. 4-O-Ethoxycarbonylmethyl-2-O-methylascochlorin (1) ; 化合物 27

水素化ナトリウム(60%, 23.1 mg, 0.578 mmol)をペンタンで洗浄後、DMF (1 ml)に懸濁した。これに 2-O-methylascochlorin (0.220 g, 0.525 mmol)の DMF(2 ml)溶液を滴下し、室温で30分攪拌した後、ブromo酢酸エチル(0.0641 ml, 0.578 mmol)を加え、50℃で4時間攪拌した。反応液を飽和塩化アンモニウム水溶液

5 にあけてエーテル抽出し、有機層を水、飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤を濾別した後、減圧濃縮し、残滓をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub> 15 g, ヘキサン-酢酸エチル) により精製して 0.204 g (77%)の (1) を得た (無色粘稠油状物質, as a colorless gum) 。

IR (film): 1765, 1713, 1694. NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): 0.70 (3H, s), 0.80 (3H, d, J=6.7 Hz), 0.83 (3H, d, J=6.9 Hz), 1.31 (3H, t, J=7.0 Hz), 1.58-1.67 (1H, m), 1.90 (3H, br s), 1.90-1.96 (2H, m), 2.34-2.44 (3H, m), 2.63 (3H, s), 3.65 (2H, d, J=7.0 Hz), 3.88 (3H, s), 4.29 (2H, q, J=7.0 Hz), 4.61 (2H, s), 5.39 (1H, d, J=16.0 Hz), 5.46 (1H, t, J=7.0 Hz), 5.89 (1H, d, J=16.0 Hz), 10.42 (1H, s). ESMS (electrospray mass spectrum, positive) (m/z): 505 {(M+H)<sup>+</sup>, C<sub>28</sub>H<sub>37</sub>O<sub>6</sub><sup>35</sup>Cl + H<sup>+</sup>},

15 507 {(M+H)<sup>+</sup>, C<sub>28</sub>H<sub>37</sub>O<sub>6</sub><sup>37</sup>Cl + H<sup>+</sup>}

#### B. 4-O-Carboxymethyl-2-O-methylascochlorin (2) ; 化合物 27

上記で得られた(1) (0.207 g, 0.409 mmol)をメタノール(6.2 ml)に溶解し、20%炭酸カリウム水溶液(1 ml, 1.45 mmol)を加えて、室温で2時間攪拌した。反応液

20 を 3N 塩酸で pH2 に調整した後、エーテルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤を濾別した後、減圧濃縮し、残滓をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub> 15 g, ジクロロメタン-メタノール) により精製して 0.122 g (63%)の (2) を得た (無色粘稠油状物質, as a colorless gum) 。

25 IR (film): 1715, 1696. NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): 0.70 (3H, s), 0.81 (3H, d, J=6.8 Hz), 0.83 (3H, d, J=6.8 Hz), 1.62 (1H, qd, J=13.5, 6.0 Hz), 1.91 (3H, br s), 1.91-1.97 (2H, m), 2.34-2.45 (3H, m), 2.63 (3H, s), 3.62 (2H, d, J=6.9 Hz), 3.84 (3H, s), 4.65 (2H, s), 5.42 (1H, d, J=16.0 Hz), 5.43 (1H, t, J=6.9 Hz), 5.89 (1H, d, J=16.0 Hz), 10.42 (1H, s).



調製 34-*O*-(4-Carboxybutanoyl)ascochlorin (4) ; 化合物 29

- ascochlorin (0.150 g, 0.358 mmol) を無水ピリジン (1.5 ml) に溶解し、4-ジ  
 5 メチルアミノピリジン(4.4 mg, 0.036 mmol)とグルタル酸無水物(0.049 g, 0.430  
 mmol)を加えた。反応液を 50℃で一晩攪拌後、1N 塩酸を加えて pH2 とし、酢  
 酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾  
 燥した。乾燥剤を濾別した後、減圧濃縮し、残滓をシリカゲルカラムクロマトグ  
 ラフィー (SiO<sub>2</sub> 13 g, ヘキサン-酢酸エチル) により精製して 0.081 g(42%)の (4)  
 10 を無色結晶として得た。

mp 120-123℃ IR(KBr disc): ~3000, 1771, 1711, 1649. NMR (CDCl<sub>3</sub>,  
 500 MHz): 0.70 (3H, s), 0.81 (3H, d, J=7.0 Hz), 0.83 (3H, d, J=7.0 Hz), 1.59-  
 1.66 (1H, m), 1.88 (3H, s), 1.89-1.96 (2H, m), 2.12 (2H, qui, J=7.2 Hz), 2.34-  
 2.45 (3H, m), 2.55 (2H, t, J= 7.2 Hz), 2.65 (3H, s), 2.76 (2H, t, J=7.2 Hz), 3.42  
 15 (2H, br d, J=6.0 Hz), 5.35 (1H, t, J=7.0 Hz), 5.39 (1H, d, J=16.0 Hz), 5.87 (1H,  
 d, J=16.0 Hz), 10.30 (1H, s), 12.54 (1H, s).

調製 44-*O*-Isonicotinoyl-2-*O*-methylascochlorin (5) ; 化合物 31

- 2-*O*-methylascochlorin (61.3 mg, 0.146 mmol) を無水ピリジン (1 ml) に溶  
 解し、塩化イソニコチノイル塩酸塩 (71.7 mg, 0.403 mmol)を加えた。反応液を  
 室温で 3 時間攪拌後、水を加えてさらに 30 分攪拌し、酢酸エチルで抽出した。  
 有機層を飽和硫酸銅水溶液、水、飽和重曹水溶液、飽和食塩水で順次洗浄後、無  
 水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤を濾別した後、減圧濃縮し、残滓をシリ  
 25 カゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub> 10 g, ヘキサン-酢酸エチル) により精製  
 して 69.3mg (90%)の (5) を得た (無色粘稠油状物質, as a colorless gum) 。

IR(film): 1760, 1710, 1700. NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): 0.69 (3H, s), 0.76-0.83  
 (6H, br), 1.59-1.64 (1H, m), 1.65 (3H, br s), 1.85-1.96 (2H, m), 2.32-2.45 (3H,  
 m), 2.67 (3H, s), 3.39-3.50 (1H, br), 3.50-3.63 (1H, br), 3.88 (3H, s), 5.29 (1H, d,

J=16.0 Hz), 5.34 (1H, t, J=7.0 Hz), 5.82 (1H, d, J=16.0 Hz), 7.79-7.99 (2H, m), 8.87 (2H, m), 10.49 (1H, s). ESMS (electrospray mass spectrum, positive) (m/z): 524 {(M+H)<sup>+</sup>, C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>NO<sub>5</sub><sup>35</sup>Cl + H<sup>+</sup>}, 526 {(M+H)<sup>+</sup>, C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>NO<sub>5</sub><sup>37</sup>Cl + H<sup>+</sup>}.

## 5 調製 5

### 4-*O*-Isonicotinoylascochlorin (6) ; 化合物 30

ascochlorin (0.200 g, 0.494 mmol) を無水ピリジン (1 ml) に溶解し、塩化イソニコチノイル塩酸塩 (0.242 g, 1.36 mmol) を加えた。反応液を室温で 3 時間攪拌後、水を加えてさらに 30 分攪拌し、エーテルで抽出した。有機層を飽和硫酸銅水溶液、水、飽和重曹水溶液、飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤を濾別した後、減圧濃縮し、生成した結晶をヘキサン-エーテルから再結晶することにより精製して 0.199 g (79%) の (6) を無色結晶として得た。

mp 119-121°C IR(film): 1752, 1711, 1642. NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz):  
 0.68 (3H, s), 0.79 (3H, d, J=7.0 Hz), 0.81 (3H, d, J=7.0 Hz), 1.59-1.65 (1H, m),  
 1.68 (3H, br s), 1.86-1.96 (2H, m), 2.33-2.44 (3H, m), 2.69 (3H, s), 3.34-3.46 (1H, br), 3.46-3.60 (1H, br), 5.29 (1H, d, J=16.0 Hz), 5.36 (1H, t, J=7.0 Hz), 5.82 (1H, d, J=16.0 Hz), 8.01 (2H, br d, J=4.6 Hz), 8.85-8.95 (2H, br), 10.35 (1H, s), 12.60 (1H, s). ESMS (electrospray mass spectrum, negative) (m/z): 508 {(M-H)<sup>-</sup>, C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>5</sub><sup>35</sup>Cl - H<sup>+</sup>}, 510 {(M-H)<sup>-</sup>, C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>5</sub><sup>37</sup>Cl - H<sup>+</sup>}.

## 調製 6

### A. 4-*O*-Acetyl-2-*O*-methyascofuranone (8) ; 化合物 27 の前駆体

4-*O*-ascofuranone (0.301 g, 0.651 mmol) をアセトン (2 ml) に溶解し、炭酸カリウム (99 mg, 0.716 mmol)、ヨウ化メチル (0.0484 ml, 0.781 mmol) を加えて 2 時間加熱還流した。反応液をろ過後、ろ液をエーテルで希釈して水、飽和重曹水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤を濾別した後、減圧濃縮し、残滓をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub> 10 g, ヘキサン-酢酸エチル) により精製して 75.5 mg (24%) の (8) を得た (無色粘稠油状

物質, as a colorless gum)。

NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): 1.22 (3H, s), 1.28 (3H, s), 1.64 (3H, s), 1.77 (3H, br s), 2.04 (2H, t, J=7.8 Hz), 2.09-2.20 (2H, m), 2.35 (3H, s), 2.39 (1H, dd, J=18.2, 10.0 Hz), 2.47 (1H, dd, J=18.0, 6.2 Hz), 2.63 (3H, s), 3.33 (2H, d, J=6.5 Hz),  
 5 3.83 (3H, s), 4.52 (1H, dd, J=10.0, 6.2 Hz), 5.08 (1H, tq, J=6.5, 1.3 Hz), 5.52 (1H, t, J=6.6 Hz), 10.44 (1H, s).

#### B. 2-O-methylascofuranone (7) ; 化合物 27

上で得た(8)(63.5 mg, 0.133 mmol)をメタノール(4.2 ml)に溶解し、1%水酸化ナ  
 10 トリウム水溶液(4.2 ml, 1.05 mmol) を加え室温で4時間攪拌した。反応液を2N  
 塩酸で中和した後、メタノールを留去し、残滓を水で希釈して酢酸エチルで抽出  
 した。有機層を水、飽和重曹水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウ  
 ムで乾燥した。乾燥剤を濾別した後、減圧濃縮し、残滓をシリカゲルカラムクロ  
 マトグラフィー(SiO<sub>2</sub> 10 g, ヘキサン-酢酸エチル)により精製して52.1 mg (90%)  
 15 の(7)を得た(無色粘稠油状物質, as a colorless gum)。

~~IR(film): 3390, 1756, 1686, 1564. NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): 1.22 (3H, s),~~  
 1.29 (3H, s), 1.64 (3H, br s), 1.80 (3H, br s), 2.06 (2H, t, J=7.5 Hz), 2.12-2.22  
 (2H, m), 2.40 (1H, dd, J=18.0, 10.0 Hz), 2.47 (1H, dd, J=18.0, 6.5 Hz), 2.66 (3H,  
 s), 3.42 (2H, d, J=6.6 Hz), 3.82 (3H, s), 4.53 (1H, dd, J=10.0, 6.5 Hz), 5.20 (1H,  
 20 tq, J=6.9, 1.2 Hz), 5.51 (1H, t, J=6.9 Hz), 6.35 (1H, s), 10.37 (1H, s). ESMS  
 (electrospray mass spectrum, negative) (m/z): 433 {(M-H)<sup>-</sup>, C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>O<sub>5</sub><sup>35</sup>Cl - H<sup>+</sup>},  
 435 {(M-H)<sup>-</sup>, C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>O<sub>5</sub><sup>37</sup>Cl - H<sup>+</sup>}。

#### 調製 7

#### 25 4-O-(4-Carboxybutanoyl)ascofuranone (9) ; 化合物 15

sacofuranone (0.100 g, 0.238 mmol) を無水ピリジン (1 ml) に溶解し、4-ジ  
 メチルアミノピリジン(2.9 mg, 0.04 mmol)とグルタル酸無水物(0.033 g, 0.490  
 mmol)を加えた。反応液を50℃で一夜攪拌後、1N 塩酸を加えてpH2とし、酢  
 酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾

乾燥した。乾燥剤を濾別した後、減圧濃縮し、残滓をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub> 10 g, ヘキサン-酢酸エチル) により精製して 0.040 g (32%) の (9) を得た (無色粘稠油状物質, as a colorless gum)。

IR(film): ~3000, 1752, 1713, 1638. NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): 1.23 (3H, s),  
 5 1.29 (3H, s), 1.63 (3H, br s), 1.74 (3H, br s), 2.02 (2H, t, J=7.5 Hz), 2.11 (2H, qui, J=7.0 Hz), 2.12-2.17 (2H, m), 2.37 (1H, dd, J=18.2, 10.0 Hz), 2.44 (1H, dd, J=18.2, 6.3 Hz), 2.54 (2H, t, J=7.0 Hz), 2.65 (3H, s), 2.76 (2H, t, J=7.0 Hz), 3.24-3.31 (2H, br), 4.55 (1H, dd, J=10.0, 6.3 Hz), 5.07 (1H, tq, J=7.0, 1.5 Hz), 5.50 (1H, br t, J=7.0 Hz), 10.30 (1H, s), 12.52 (1H, s).

10

#### 調製 9

##### 4-O-Isonicotinoylascochlorin (10) ; 化合物 14

ascofuranone (0.200 g, 0.476 mmol) を無水ピリジン (1 ml) に溶解し、塩化イソニコチノイル塩酸塩 (0.233 g, 1.31 mmol) を加えた。反応液を室温で 1 時間  
 15 攪拌後、水を加えてさらに 30 分攪拌し、エーテルで抽出した。有機層を飽和硫酸銅水溶液、水、飽和重曹水溶液、飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤を濾別した後、減圧濃縮し、残滓をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub> 10 g, ヘキサン-酢酸エチル) により精製して 0.135 g (54%) の (10) を得た (無色粘稠油状物質, as a colorless gum)。

20 IR(film): 1756, 1644. NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): 1.21 (3H, s), 1.28 (3H, s), 1.53 (3H, br s), 1.62 (3H, br s), 1.88-1.97 (2H, m), 2.02-2.12 (2H, m), 2.35 (1H, dd, J=18.0, 10.0 Hz), 2.42 (1H, dd, J=18.0, 6.3 Hz), 2.69 (3H, s), 3.21-3.33 (1H, br), 3.33-3.46 (1H, br), 4.51 (1H, dd, J=10.0, 6.3 Hz), 5.09 (1H, br t, J=7.0 Hz), 5.48 (1H, br t, J=7.0 Hz), 8.00-8.02 (2H, m), 8.89-8.91 (2H, m), 10.35 (1H, s),  
 25 12.60 (1H, s). ESMS (electrospray mass spectrum, negative) (m/z): 524 {(M-H)<sup>-</sup>, C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>6</sub><sup>35</sup>Cl - H<sup>+</sup>}, 526 {(M-H)<sup>-</sup>, C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>6</sub><sup>37</sup>Cl - H<sup>+</sup>}

#### 実施例 1

一錠中に化合物-1、63mg、セスキオレエート・ソルピタン 10 mg、粉末シリ

- カゲル 10 mg、とうもろこし澱粉 40 mg、L-ヒドロキシプロピルセルロース(PO-30) 50 mg、ヒドロキシプロピルセルロース-SL 12 mg、微結晶セルロース 46 mg、カルボキシメチルセルロース・ナトリウム塩 10 mg、ステアリン酸カルシウム 3 mg、タルク 6 mg を含むよう各原料を混合し、定法通りに顆粒化してから打錠して錠剤化した。

### 実施例 2

- 粉碎した化合物-11、63 g に乳糖 50 グラム、コーンスターチ 60 g、L-ヒドロキシプロピルセルロース 30 g、ヒドロキシプロピルセルロース-SL 12 g、微結晶セルロース 46 g、カルボキシメチルセルロースⅡナトリウム塩 10 g、ステアリン酸カルシウム 3 g、タルク 6 g を混合し、定法通りに顆粒化してから打錠して一錠が 0.25 g の錠剤とした。

### 実施例 3

- 化合物-21、100 g、微結晶セルロース 70 g、乳糖 35 g、カルボキシメチルセルロース・カルシウム塩 70 g、コーンスターチ 70 g 及びステアリン酸マグネシウム 5 g を混合し、定法通りに打錠して一錠が 0.35 g の錠剤を調整した。

### 実施例 4

- 移入遺伝子活性検定系において、本発明の化合物はリポーター遺伝子の発現を増大させた。すなわち、PPAR 応答エレメントによって発現が制御されるリポーター遺伝子プラスミドと PPAR $\gamma$  発現プラスミドを COS-1 細胞に導入した後、その導入細胞を本発明の化合物で処理すると、リポーター遺伝子の発現量が増加する。この結果は本発明の化合物が PPAR のアゴニストであり、これらの化合物が PPAR を介して遺伝子の発現を制御していることを示している。

COS-1 細胞へのプラスミド導入：遺伝子導入は Life Technologies 社の LipofectAMINE 試薬を用いて定法通りに行った。1 X 10<sup>5</sup> の細胞を 10% ウシ胎児血清を含む 2 ml のダルベッコの最小培地(DMEM)に分散させて 35 mm のペトリ皿に流し込み、炭酸ガス孵卵器中で 17 時間培養した。次に培地を除去し、ペト

リ皿に接着している細胞をリン酸生理食塩水(PBS)で洗浄した後、LipofectAMINE 試薬を用いて遺伝子導入を行った。すなわち、PPAR 応答エレメントによって発現が制御されるルシフェラーゼ遺伝子プラスミド、PPAR 発現プラスミド及び遺伝子導入率をしらべるため $\beta$ ガラクトシダーゼ遺伝子プラスミドをそれぞれ4 mg、  
5 4 mg、2 mg 含む最小血清培地、OptiMEM(Life Technologies 社)500 ml と LipofectAMINE 50 ml を溶かした OptiMEM 500 ml をあらかじめ混合して、室温で15分間保温した。この混合液100 ml と OptiMEM 400 ml を混合してペトリ皿に加え、炭酸ガス孵卵器中で三時間37℃で保温した。遺伝子導入用培地をペトリ皿から吸引して除去し、活性炭処理した血清10%と被験物質を含むDMEM  
10 培地を加え、37℃で20時間培養した。被験物質としては化合物番号1、11、12及び20、対照としてピオグリタゾン及びトログリタゾンを加えた。さらに、被験物質の溶媒であるジメチルスルフォキシド(最終濃度0.1%)を培地に加えた。

ペトリ皿の培地を吸引して除去した後、250 ml の培養細胞溶解液(25 mM Tris phosphate buffer (pH 7.8)、2 mM 1,2-diaminocyclo-hexane-N, N, N', N'-

15 tetraacetate、10% glycerol、1% Triton X-100 を加え、ラバーポリスマンで細胞を剥離して集めた。凍結融解して細胞を完全に破壊した後、-4℃で遠心分離

(15,000 rpm, 2 min)した上清を測定用の試料とした。20 ml の上清に100 ml のルシフェラーゼ基質溶液(2.14 mg Co-A, 100 ml 470 mM D-Luciferin, 200 ml 530 mM ATP, 2 ml の DTT-Tricine buffer (pH 7.8)を添加し、ルミノメーター(ATTO

20 ルミノセンサーAB-2000)で蛍光を測定した。導入効率測定用の $\beta$ ガラクトシダーゼ測定には、Luminescent  $\beta$ -galactosidase detection kit II (Clontech)を用いて、蛍光をルミノメーターで測定した。結果は表5で示すように本発明の化合物はPPARの特異的なリガンドであることが判明した。

表 5. 本発明の化合物による PPAR リセプターの活性化と移入遺伝子の転写増大

化合物名	受容体の活性化		
	PPAR $\alpha$	PPAR $\beta$	PPAR $\gamma$
トログリタゾン	—	—	++++
ピオグリタゾン	—	—	++++
化合物-1	—	—	+++
化合物-7	—	—	+++
化合物-21	—	—	++
化合物-25	—	—	+++
化合物-26	—	—	++
化合物-27	—	—	++
化合物-29	—	—	+++
デヒドロアスコフラノン	++	—	—

活性化の度合いは次のように表した。

++++ :  $<10^{-6}$ M 以下に活性化のピークがある

+++ :  $10^{-6} \sim 10^{-5}$ M に活性化のピークがある

++ :  $10^{-5} \sim 10^{-4}$ M に活性化のピークがある

+ :  $>10^{-4}$ M にピークがある

#### 実施例 5

- 10 本発明の化合物は、結節性動脈周囲炎及び動脈瘤を阻止する効果を示す。動脈瘤阻止効果を判定するため、定量的に取り扱えるラット高血圧症モデルを用い、
- 腸間膜動脈に生じた動脈瘤を計測し統計処理して効果を判定した。摘出した腸間膜から膜部分をピンセットで除去し、残った細動脈をホルマリン固定した後、脂肪染色した。動脈の本数及び動脈瘤の数を三回数え、平均して細動脈一本あたりの動脈瘤数を算出する方法である。高血圧モデルとしては、片側の腎臓を摘出して腎機能を低下させたラットに、飲料水としては血漿の浸透圧よりやや高い 0.9% の食塩水を与え、一週間ごとにミネラル・コルチコイドであるデオキシコルチコステロン・アセテート (DOCA) を 10 mg/kg 皮下投与した。麻酔下にウイスター系雄ラット (12 頭) から左側腎臓を摘出した。腎臓摘出ラットは一週間の回復期間の後に無作為に二群に群分けした (n=6)。二群のなかの一つを対照群、他方を化合物-1 投与群とした。化合物-1 は実験開始三週目から 100 mg/kg を強制経口投与した。実験期間は 7 週間とし、実験開始とともに各群の摂餌量、飲水量、尿量、体重及び血圧を三日ごとに測定した。

血圧は急速に上昇し 3 週目には平均血圧が 180 mmHg を越えた。三週目から

- 化合物-1 の経口投与を開始したが、対照群と比べ有意な血圧上昇阻止作用は認められなかった。7 週目に解剖し、腸間膜動脈を摘出し、ホルマリン処理の後、脂肪染色して動脈瘤の数を数えた。高血圧対照群は、すべての個体に動脈瘤を認め、一本の腸間膜動脈あたり平均  $1.72 \pm 0.74$  個(mean  $\pm$  SE)の動脈瘤を数え、高血圧性の動脈病変が進展していることを示唆した。化合物-1 群では一本の細動脈あたりの動脈瘤は平均  $0.51 \pm 0.37$  個(mean  $\pm$  SE)であった。本発明の化合物は、結節性動脈周囲炎から動脈瘤への進展を抑制することは明らかである。

#### 実施例 6

- 10 化合物-17 の遺伝性肥満糖尿病マウス C57BL/ksj db/db における多飲多尿の改善と尿糖排泄抑制効果を次のような実験で証明した。30～32 週令の雄性 db/db マウス 10 頭をランダムで 2 群に分け(n=5)、一方を対照群、他方を化合物-17 群とした。飼料および飲料水を自由摂取させた。飼料は日本クレアのマウスⅡラット様標準飼料 CE-2 粉末とし、化合物-17 をアセトンに溶かした後、溶液を飼料に振りかけ、風乾してアセトンを飛散させてからペレットに成形した。化合物-17  
15 の添加量は、飼料の 0.1%である。対照飼料も同量のアセトンを振りかけた後、ペレット化した。

- 両群とも最初の 7 日間は対照飼料を与え、摂餌量、尿量、尿糖濃度および尿糖排泄量をしらべた。次の 5 日間は治療群に化合物-17 を 0.1%混合した飼料を与えた。薬物投与群はさらに 4 日間、対照飼料に戻して飼育してから、20～24 日目の 5 日間は再び 0.1%化合物-17 含有飼料を与えた。db/db マウスは代謝ケージに個別飼育すると、摂餌量、飲水量が大きく変動するので、5 頭をラット用代謝ケージに収容し、ケージ毎に得られた数値は 5 で除して図 1 に示した。図 1 から明らかのように、化合物-17 を飼料に混合して与えると、尿量、尿糖濃度及び尿糖排泄量が激減することがわかる。投与を中止しても 24 時間後でも尿糖排泄量は、対照期間と比べて 50%以下で化合物-17 は持ち越し効果を有することがわかる。

#### 実施例 7 (ストレプトゾトシン糖尿病に対するアスコフラノンの軽減作用)

体重約 250 グラムのウイスター系雄ラットにストレプトゾトシン (50 mg/kg)



を尾静脈から注入し、インスリン欠乏性糖尿病モデルを作成した。化合物-1 はストレプトゾトシン投与の直後から一日一回、100 mg/kg をアラビアゴム液に懸濁して経口投与した。動物は7日目と14日目に採尿ケージに24時間収容し、24時間用を採取した。表6に示すように健常対照群の飲水量と比べ糖尿病対照群の

5 それは7日目で4.1倍、14日目で4.5倍に増加した。これに対し、化合物-1投与群では糖尿病対照群と比べ、7日目で41.4%、14日目で43.6%と有意に低いレベルに抑制された。三群の摂餌量、飲水量、尿量及び尿糖排泄量を表に示した。糖尿病対照群の摂餌量は健常対照群と比べ約1.5倍に増加し、化合物-1投与群では糖尿病対照群と比べ7日目で14.3%、14日目で23.3%それぞれ有意に減少した。

10 しかし、体重増加は健常群が80 g/週であるのに対し、糖尿病対照群は僅かに18 g/週の増加にとどまった。化合物-1投与群は、糖尿病対照群より摂餌量が少ないにもかかわらず30 g/週の体重増加を示した。化合物-1の投与によって代謝が改善され、尿糖の排泄が大きく減少したためである。

15

表6

	測定日	糖尿病対照群	糖尿病 化合物-1投与群	健常対照群
摂餌量 (g/rat)	7	38.4 ± 1.7	32.9 ± 1.9*	27.0 ± 3.2*
	14	42.5 ± 1.7	32.6 ± 2.9*	26.8 ± 0.9**
飲水量 (ml/rat/day)	7	169.5 ± 7.6	99.9 ± 13.0**	41.6 ± 1.1**
	14	189.6 ± 5.7	106.9 ± 18.0**	42.4 ± 1.0**
尿量 (ml/rat/day)	7	128.5 ± 5.3	74.6 ± 6.4**	19.8 ± 1.7**
	14	159.8 ± 5.3	79.7 ± 12.5**	17.5 ± 0.8**
尿糖排泄量 (g/rat/day)	7	8.85 ± 0.36	5.39 ± 0.55**	検出限界以下
	14	12.05 ± 0.38	5.78 ± 1.09**	検出限界以下
体重 (g/rat)	7	291.0 ± 4.7	307.7 ± 4.8	350.4 ± 10.2**
	14	292.5 ± 4.2	318.3 ± 6.8*	370.4 ± 10.2**

糖尿病対照群、n=9、糖尿病化合物-1投与群、n=8、健常対照群、n=5

\*P<0.05, \*\*P<0.01, in Student's t-test.

### 実施例 8

10 頭の 12 週令 db/db マウス尾静脈から採血し、両群の平均血糖値が 700 mg/dl 前後になるよう 5 頭ずつ二群に分け、一群を対照群、他方を化合物-25 投与群として採尿ケージに収容した。化合物-25 は一日一回、60 mg/kg を経口投与した。

- 5 実験開始から 1, 2, 3, 5, 7 及び 10 日目に尾静脈から少量を採血して血糖を測定した。また、同じタイミングで 24 時間尿を集め、尿糖排泄量を酵素法で測定した。結果は図 2 に示すとおり尿糖は投与開始の翌日で半分に減少しており、3 日目以降は 90% 以上も排泄量が減少した。血糖は投与 3 日目から有意に減少し、7 日目で 30% 以上の低下率を示した。

10

### 実施例 9

体重 25 グラムの雌性 NOD マウス 40 頭をランダムに 4 群に分け、一群を対照群、一群を化合物-1 50mg/kg 投与群、一群を化合物-1 (25mg/kg) 投与群、残りの一群を化合物-25 (50 mg/kg) 投与群とした。化合物-1 及び化合物-25 は 2% アラビアゴム液に懸濁して毎週二回、月曜と金曜に腹腔内に投与した。マウスは 24 週間飼育し、この間月曜と金曜に尿糖検出テープを用いて尿糖排泄の有無を検査した (図 3)。

15

### 実施例 10

20 表面プラズモン共鳴センサーは (商品名: ピアコア・カラム) を使って固定した PPAR $\gamma$  リセプターに本発明の化合物が結合するかどうかを検定した。図 4 に化合物-27 と対照として用いたピオグリタゾンについてのセンサーグラムを示す。図から明らかなように本発明の化合物は in vitro でも PPAR $\gamma$  リセプターに結合するのに対し、対照として用いたピオグリタゾンは結合しない。

25

### 実施例 11 (担ガンママウスの化合物-1 による高脂血症阻止)

この実験では悪疫質の指標として、正確な測定が難しい血中の TNF $\alpha$  より簡単に測定できる血清中性脂肪を選び、定量化が困難な TNF $\alpha$  の動態を知るための補助マーカーとした。雄性の 5 週令 ddY 系マウス 40 頭を無作為に 5 群に分け (n=8)、

そのうち4群の腹腔内にエーリッヒ腹水ガン細胞  $2 \times 10^6$  個を移植した。ガン細胞を移植しない群は、健常対照群とした。ガン細胞の移植24時間後から三つの群に化合物-1をそれぞれ100~400 mg/kgを腹腔内投与し、残りの一群は化合物-1を含まぬ溶媒である0.1%ツイーン-80 (0.2 ml)のみを投与した。ガン細胞移植の8日目に担ガンマウスの心臓より採決し、分離した血清を用いて中性脂肪を定量し、血中のTNF $\alpha$ は免疫電気泳動法で検出した。

表7. 化合物-1による担ガンマウス的高中性脂肪血症阻止作用 (平均値 $\pm$ 標準誤差)

投与量 (mg/kg)	体重 (g/mouse)	血清中性脂肪 (mg/dl)	統計的有意差 <sup>a)</sup>	血中TNF $\alpha$
0	40.0 $\pm$ 1.0	401.1 $\pm$ 73.8		++++
100	38.0 $\pm$ 1.0	258.2 $\pm$ 53.2	NS	+++
200	36.7 $\pm$ 0.7	185.1 $\pm$ 26.2*	P<0.02	++
400	31.3 $\pm$ 1.1	99.1 $\pm$ 18.3**	P<0.002	++
0 (正常対照群)	30.0 $\pm$ 0.5	47.7 $\pm$ 3.5***	P<0.001	+

a) Student's t-test. (n=8)

10

担ガンマウスの体重増加は、ガン細胞増殖に伴って増加する腹水貯留によるものである。

表7に示すように対照群マウスの血清中性脂肪は、健常マウスのそれと比べ大きく上昇している。さらに飼料の摂取量を健常と担ガンで比較すると、担ガンマウスの摂取量は日を追って減少し、6日目を過ぎるあたりからエネルギーバランスはネガティブになっていることが伺われる。つまり、エーリッヒ腹水ガンによる死因は、飼料から摂取するエネルギーが消費を下回ったための餓死である。ガン細胞からのTNF $\alpha$ 過剰放出による(a)異化反応の昂進、(b)末梢組織におけるインスリン抵抗性の発現によるグルコース同化反応の低下、(c)ガン細胞によるグルコースの優先的な消費が重なり、生体はエネルギー不足を補うため筋肉の蛋白質を動員し、肝臓で中性脂肪に転換して末梢組織に送り込む状態に陥っていることを示唆している。

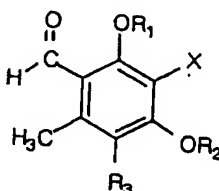
一方、化合物-を投与した群は、用量依存性に血清中性脂肪の増加が抑制され、血糖値の有意な増大がみられ、血中TNF $\alpha$ も低下傾向になるところから、化合物-1はガン細胞によるTNF $\alpha$ 産生を抑制していることが示された。

## 請 求 の 範 囲

1. アスコフラノン；並びにアスコフラノン同族体又はアスコクロリン同族体であって、少なくともオルシラルデヒド部分を有し、該オルシラルデヒド部分の2位及び／又は4位の水酸基の水素が、 $-(C_1 \sim C_{15})$  アルキル若しくはアルケニル、アリール、 $(C_1 \sim C_{15})$  アルキルアリール、 $-CH_2COOH$ 、 $-CH_2COO(C_1 \sim C_{15})$  アルキル、 $-C(=O)(C_1 \sim C_{15})$  アルキル、 $-C(=O)$  アリール、 $-C(=O)(C_1 \sim C_{15})$  アルキルアリール、 $-C(=O)(CH_2)_{1 \sim 5}COOH$ 、ニコチノイル又はイソニコチノイルからなる群より選択される基により置換されている前記同族体；からなる群より選択される化合物である、核内リセプターPPARのリガンド。

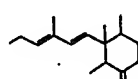
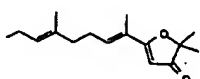
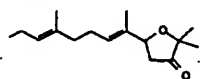
2. 化合物が、式：

15

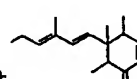


[式中、

Xは、



又は



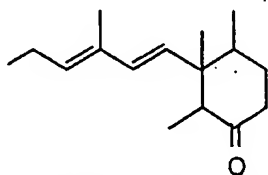
であり；

- 20  $R_1$ は、H、 $-(C_1 \sim C_5)$  アルキル又はアルケニル、又は $-C(=O)(C_1 \sim C_5)$  アルキルであり；

$R_2$ は、H、 $-(C_1 \sim C_5)$  アルキル又はアルケニル、 $-CH_2COOH$ 、 $-CH_2COO(C_1 \sim C_5)$  アルキル、 $-C(=O)(C_1 \sim C_5)$  アルキル、 $-C(=O)(CH_2)_{1 \sim 5}COOH$ 、ニコチノイル又はイソニコチノイルであり；及び

- 25  $R_3$ は、H又はC1である

(但し、Xが



であり、 $R_1$ がHであり、 $R_2$ がHであり、かつ $R_3$ がC1である場合を除く）]

- 30 で表される、請求項1に記載の核内リセプターPPARのリガンド。



[式中

$R^1$ は、H、 $-(C_1 \sim C_5)$  アルキル又はアルケニル、又は $-C(=O)(C_1 \sim C_5)$  アルキルであり；及び

$R^2$ は、H、 $-(C_1 \sim C_5)$  アルキル、 $-CH_2COOH$ 、 $-CH_2COO(C_1 \sim C_5)$  アルキル、 $-C(=O)(C_1 \sim C_5)$  アルキル、 $-C(=O)(CH_2)_{1 \sim 5}COOH$ 、ニコチノイル又はイソニコチノイルである

(但し、 $R^1$ がHであり、かつ $R^2$ が $-CH_2COOH$ 又はニコチノイルである場合を除く) ]

で表される化合物、又はその医薬として許容できる塩。

10

5. 請求項3又は4に記載の化合物である、核内リセプターPPARのリガンド。

6. 核内リセプターPPAR リガンド依存性の遺伝情報の転写の制御により改善される疾患又は状態の治療及び／又は予防のために有効な量の請求項1、2又は5項に記載の核内リセプターPPARのリガンドと、医薬として許容できる添加物とを含む、前記疾患又は状態の治療及び／又は予防用医薬組成物。

7. 疾患又は状態が、インスリン抵抗性発現によるⅡ型糖尿病を含む糖尿病；高血圧症又は脳血管障害；心臓冠状動脈硬化症を含む動脈硬化症；糖尿病合併症；血管、肝臓、腎臓、関節、腸管及び膵臓を含む臓器の慢性炎症、並びに自己免疫疾患に関連する慢性炎症を含む慢性炎症；末期ガン患者に起こる悪液質；大腸ガン、胃ガン、及び肝臓ガンを含む消化器系のガンである、請求項6に記載の医薬組成物。

25

8. 膵臓ランゲルハンス島 $\beta$ 細胞が変性及び／又は壊死するのを阻止するために有効な量の請求項1、2又は5項に記載の核内リセプターPPARのリガンドと、医薬として許容できる添加物とを含む、膵臓ランゲルハンス島 $\beta$ 細胞が変性及び／又は壊死するのを阻止し、前記細胞にインスリン産生機能を保持させる

ための組成物。

9. 添加物が、脂肪族系合成界面活性剤又は有機溶媒可溶高分子助剤である、請求項6、7又は8項に記載の組成物。

5

10. 哺乳動物における核内リセプターPPAR リガンド依存性の遺伝情報の転写の制御により改善される疾患又は状態の治療及び／又は予防のための方法であって、治療及び／又は予防のために有効な量の請求項1、2、3又は4に記載の化合物を、所望により医薬として許容できる添加物とともに、哺乳動物に投与

10 することを含む、前記方法。

11. 疾患又は状態が、インスリン抵抗性発現によるⅡ型糖尿病を含む糖尿病；高血圧症又は脳血管障害；心臓冠状動脈硬化症を含む動脈硬化症；糖尿病合併症；血管、肝臓、腎臓、関節、腸管及び膵臓を含む臓器の慢性炎症、並びに自己免疫疾患に関連する慢性炎症を含む慢性炎症；末期ガン患者に起こる悪液質；大腸ガン、胃ガン、及び肝臓ガンを含む消化器系のガンである、請求項10に記載の方法。

15

12. 哺乳動物における膵臓ランゲルハンス島β細胞が変性及び／又は壊死

20 するのを阻止するための方法であって、変性及び／又は壊死するのを阻止するために有効な量の請求項1、2、3又は4項に記載の化合物を、所望により医薬として許容できる添加物とともに、哺乳動物に投与することを含む、前記方法。

13. 添加物が、脂肪族系合成界面活性剤又は有機溶媒可溶高分子助剤である、請求項10、11又は12に記載の方法。

25

14. 哺乳動物における核内リセプターPPAR リガンド依存性の遺伝情報の転写の制御により改善される疾患又は状態の治療及び／又は予防のための、所望により医薬として許容できる添加物をともに用いる、治療及び／又は予防のため

に有効な量の請求項 1、2、3 又は 4 に記載の化合物の使用。

15 15. 疾患又は状態が、インスリン抵抗性発現によるⅡ型糖尿病を含む糖尿病；高血圧症又は脳血管障害；心臓冠状動脈硬化症を含む動脈硬化症；糖尿病合併症；血管、肝臓、腎臓、関節、腸管及び膵臓を含む臓器の慢性炎症、並びに自己免疫疾患に関連する慢性炎症を含む慢性炎症；末期ガン患者に起こる悪液質；大腸ガン、胃ガン、及び肝臓ガンを含む消化器系のガンである、請求項 14 に記載の使用。

10 16. 哺乳動物における膵臓ランゲルハンス島β細胞が変性及び／又は壊死するのを阻止するために、所望により医薬として許容できる添加物をともに用いる、変性及び／又は壊死するのを阻止するために有効な量の請求項 1、2、3 又は 4 に記載の化合物の使用。

15 17. 添加物が、脂肪族系合成界面活性剤又は有機溶媒可溶高分子助剤である、請求項 14、15 又は 16 に記載の使用。

---

20 18. 哺乳動物における核内リセプターPPAR リガンド依存性の遺伝情報の転写の制御により改善される疾患又は状態の治療及び／又は予防用医薬の製造のための、所望により医薬として許容できる添加物をともに用いる、請求項 1、2、3 又は 4 に記載の化合物の使用。

25 19. 疾患又は状態が、インスリン抵抗性発現によるⅡ型糖尿病を含む糖尿病；高血圧症又は脳血管障害；心臓冠状動脈硬化症を含む動脈硬化症；糖尿病合併症；血管、肝臓、腎臓、関節、腸管及び膵臓を含む臓器の慢性炎症、並びに自己免疫疾患に関連する慢性炎症を含む慢性炎症；末期ガン患者に起こる悪液質；大腸ガン、胃ガン、及び肝臓ガンを含む消化器系のガンである、請求項 18 に記載の使用。



20. 哺乳動物における膵臓ランゲルハンス島 $\beta$ 細胞が変性及び／又は壊死するのを阻止するための医薬の製造のための、所望により医薬として許容できる添加物をともに用いる、請求項1、2、3又は4項に記載の化合物の使用。

- 5     21. 添加物が、脂肪族系合成界面活性剤又は有機溶媒可溶高分子助剤である、請求項18、19又は20に記載の使用。

22. 核内リセプターPPARのリガンドとして機能可能な化合物と血清タンパク質のアミノ基とのシッフ塩基であって、該化合物が請求項1、2、3又は4  
10     に記載の化合物である、前記シッフ塩基。

图 1

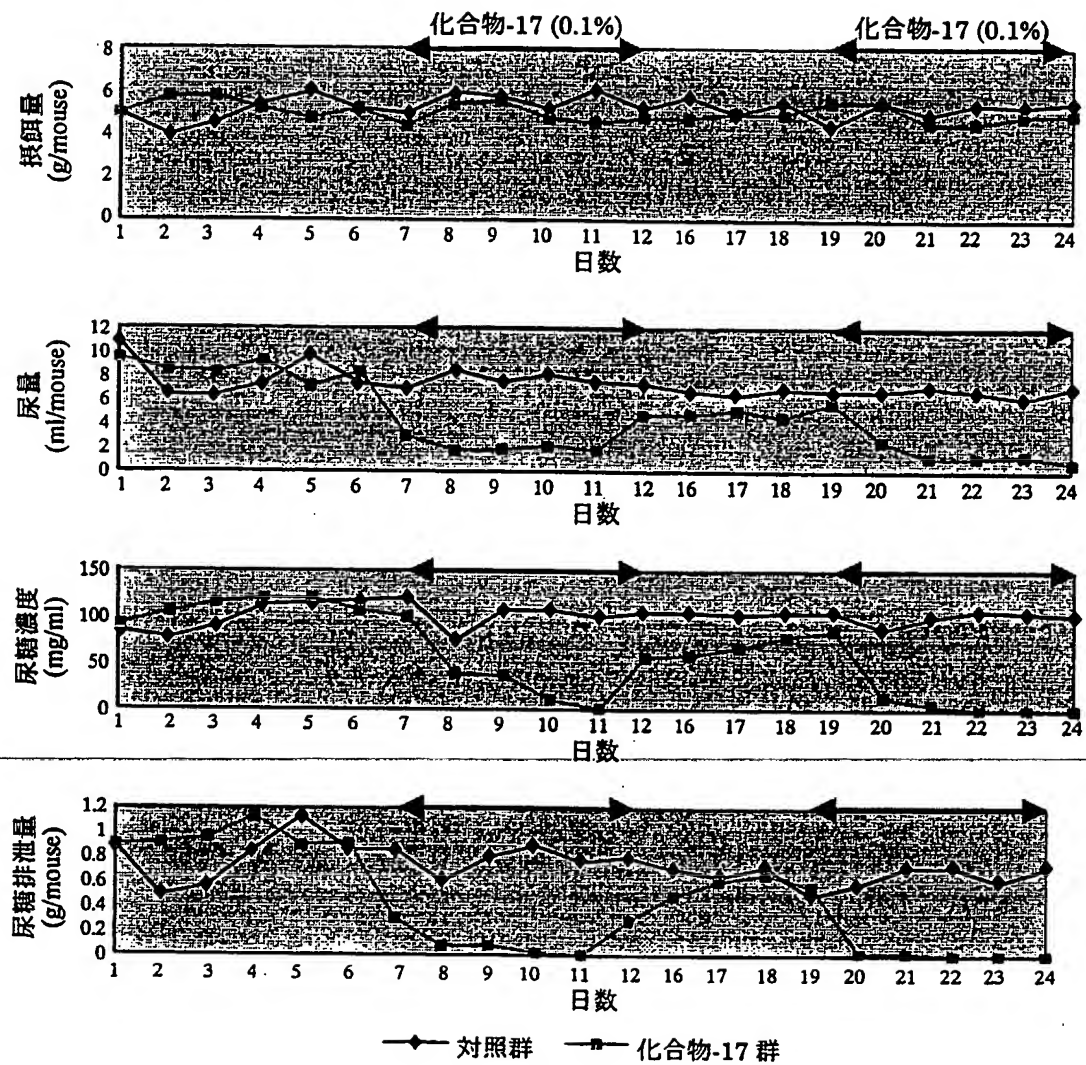
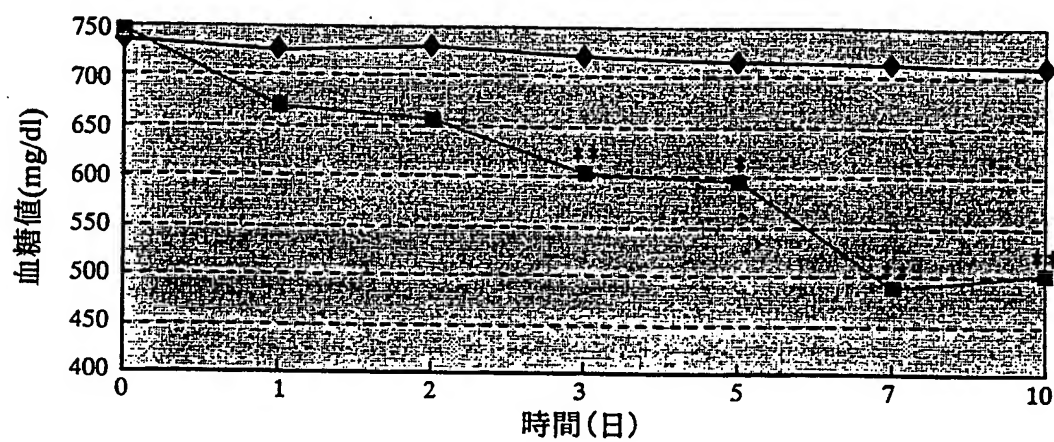
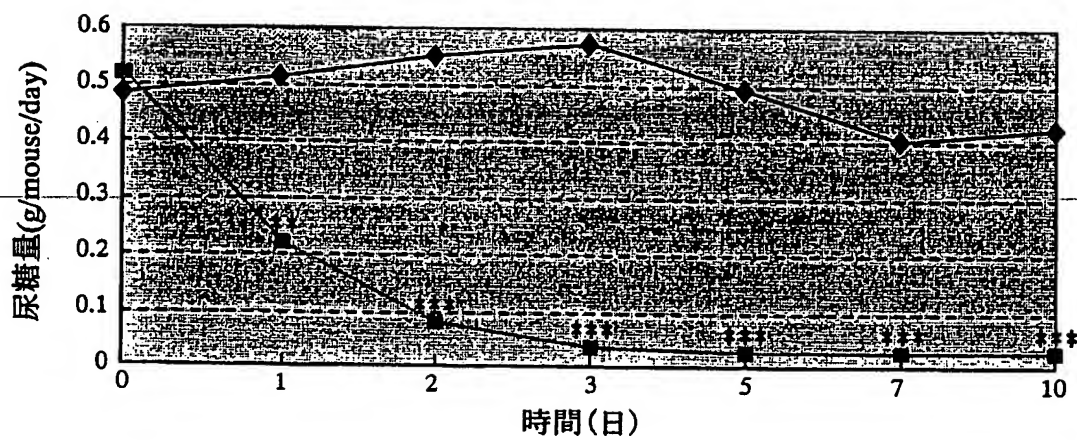


図 2



\* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ , in Student t-test



\*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ , in Student t-test

—◆— 対照群    —■— 化合物-25 群

図 3

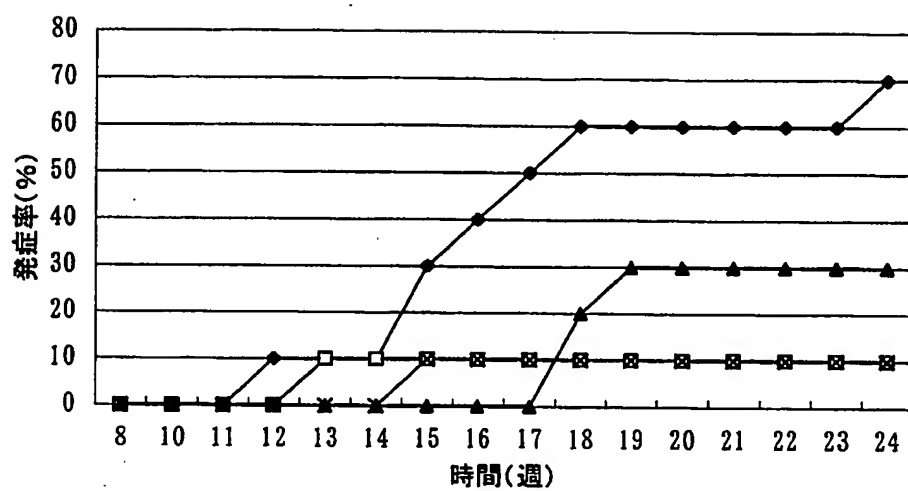
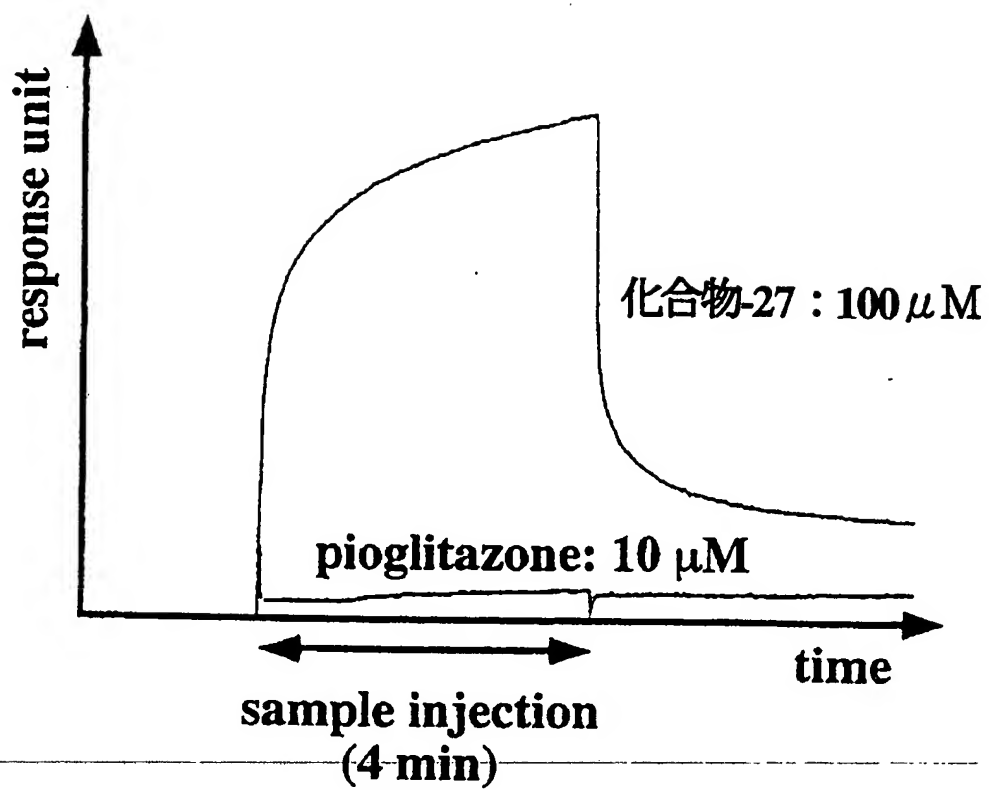


図 4



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01497

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07C59/92, C07C69/738, C07C403/20, C07C403/24, C07D213/79, C07D213/80, C07D307/32, C07D307/58, A61K31/12, A61K31/122, A61K31/192, A61K31/216, A61K31/341, A61K31/455, A61P3/10, A61P9/10, A61P9/12, A61P19/12, A61P35/00, A61P37/00, A61P37/06, C07K14/765

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07C59/92, C07C69/738, C07C403/20, C07C403/24, C07D213/79, C07D213/80, C07D307/32, C07D307/58, A61K31/12, A61K31/122, A61K31/192, A61K31/216, A61K31/341, A61K31/455, A61P3/10, A61P9/10, A61P9/12, A61P19/12, A61P35/00, A61P37/00, A61P37/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP, 74628, A2 (CHUGAI SEIYAKU K.K.), 23 March, 1983 (23.03.83), abstract; claims, page 1, lines 13 to 21; example 17 & JP, 58-43938, A & JP, 58-69860, A & US, 4500544, A & US, 4542143, A & CA, 1192557, A & ZA, 8206528, A & AT, 20052, E & CS, 244911, B2 & CS, 245791, B2 & ES, 515648, A1 & ES, 522459, A1	1, 2, 4-9, 18-21
X	WO, 94/04520, A1 (IMMUNO JAPAN INC.), 03 March, 1994 (03.03.94), abstract; claims; example 1 (Family: none)	1-3, 5-9, 18-21
X	WO, 94/05274, A1 (IMMUNO JAPAN INC.), 17 March, 1994 (17.03.94), abstract; claims & JP, 6-305959, A	1, 2, 4-9, 18-21
X	JP, 7-206838, A (IMMUNO JAPAN INC.), 08 August, 1995 (08.08.95), abstract; claims (Family: none)	1-3, 5-9, 18-21

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
24 May, 2000 (24.05.00)

Date of mailing of the international search report  
06.06.00

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01497

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 62-181271, A (SAGAMI CHEMICAL RESEARCH CENTER), 08 August, 1987 (08.08.87), claims, page 1, lower right column, lines 8 to 6 from the bottom (Family: none)	1-3,5-7,9, 18,19,21
X	JP, 51-110035, A (Masashi OKADA), 29 September, 1976 (29.09.76), claims & AU, 7578668, A1	1,2,4,5-7,9, 18,19,21
X	JP, 51-36450, A (CHUGAI SEIYAKU K.K.), 27 March, 1976 (27.03.76), Claim, page 1, lower right column, line 6 to page 2, upper left column, line 11 (Family: none)	1-3,5-7,9, 18,19,21
X	US, 5420334, A (MERCK & CO., INC.), 30 May, 1995 (30.05.95), abstract; claim 14 & GB, 2288173, A1	1,2,4,5-7,9, 18,19,21
X	GB, 1498334, A (Masashi OKADA), 18 January, 1978 (18.01.78), page 1, lines 5 to 21 (Family: none)	1-3,5-7,9, 18,19,21
X	GB, 1495353, A (CHUGAI SEIYAKU K.K.), 14 December, 1977 (14.12.77), page 1, lines 6 to 12; claims & DE, 2515142, A1 & US, 3995061, A & CA, 1057306, A1 & NL, 7504079, A & FR, 2267094, A1	1,2,4,5-7,9, 18,19,21
X	US, 3546073, A (AMERICAN CYANAMID CO.), 08 December, 1970 (08.12.70), abstract; column 2, lines 33 to 40; formula(VII) (Family: none)	1,2,4,5-7,9, 18,19,21
Y	WO, 99/07357, A1 (ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 18 February, 1999 (18.02.99), abstract; page 2, line 7 to page 4, line 6 & AU, 9885595, A1	1-9,18-21
Y	WO, 98/57631, A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 23 December, 1998 (23.12.98), abstract; page 2, line 2 to page 3, line 8 & US, 5925657, A & AU, 9881471, A1	1-9,18-21
Y	WO, 98/43081, A1 (LIGAND PHARMACEUTICALS INCORPORATED), 01 October, 1998 (01.10.98), abstract; page 2, lines 4 to 7, lines 21 to 29; page 6, line 4 to page 7 line 10 & AU, 9867735, A1	1-9,18-21
Y	NATURE (LONDON), Vol.391, No.6662, (1998) Mercedes Ricote et al., "The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ is a negative regulator of macrophage activation", pp.79-82 Cited in the specification of this application	1-9,18-21
Y	NATURE (LONDON), Vol.391, No.6662, (1998) Chengyu Jiang et al. "PPAR- $\gamma$ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines" pp.82-86 Cited in the specification of this application	1-9,18-21

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01497

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Naibunpitsu · Tounyoubyou-ka , Vol.6, No.6, (1998) SUGIYAMA Takuya et al, "Insulin sensitivity and retinoid X receptor", pp.551-557 Chemical Abstracts, Vol.130, see abstract No.10218	1-9, 18-21



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01497

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 10-17  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The subject matter of claim 10-17 corresponds to "a method for treatment of the human body by therapy" (PCT Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.: 1,6-22  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
(See Extra Sheet)
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(See Extra Sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claims 1 to 9 and 18 to 21

(As stated in Column I-1, claims 10 to 17 pertain to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.)

- Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01497

Continuation of Box I, 2

It is unclear how far compounds are involved in the category of "ascofuranone homologs and ascochlorin homologs having at least an orcyyl aldehyde moiety wherein the hydrogen atom(s) of the hydroxyl group(s) at the 2-position and/or the 4-position of the orcyyl aldehyde moiety are substituted by C<sub>1-15</sub> alkyl, ----- isonicotinoyl, etc." as described in claim 1, in addition to the compounds represented by the formulae as set forth in claims 2 to 4.

Therefore, invention as set forth in claim 1 and inventions as set forth in claims 6 to 22 with citation of claim 1 are unclear.

It is unclear how far diseases/conditions are involved in the scope of "diseases or conditions which can be ameliorated by regulating the transcription of genetic information depending on the nuclear receptors PPAR's" as described in claims 6, 10 and 14, in addition to the diseases/conditions as cited in claims 7, 11 and 15 and the diseases/conditions as particularly disclosed in the description.

Regarding claims 1, 6 to 9 and 18 to 22, the International Search has been practiced on the compounds represented by the formulae as set forth in claims 2 to 4. Regarding claims 6 and 14, the International Search has been practiced on the diseases/conditions as cited in claims 7 and 15 and the diseases/conditions as particularly disclosed in the description.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01497

## Continuation of Box II

As will be described hereinafter, the International Searching Authority has recognized that this international application has four inventions.

- Among inventions as set forth in claims 1 to 21, those wherein the "ligands of nuclear receptors PPAR's" are novel compounds.

- Among compounds as set forth in claims 1 to 5, those relating to publicly known compounds.

- Among inventions as set forth in claims 6 to 21, those wherein the "ligands of nuclear receptors PPAR's" are publicly known compounds.

- Invention as set forth in claim 22.

Inventions as set forth in claims 1 to 5 are inventions relating to compounds per se which are "ascofuranone; and ascofuranone homologs and ascochlorin homologs" having properties as "ligands of nuclear receptors PPAR's" and these inventions involve two concepts, namely, inventions relating to publicly known compounds (for example, compounds #1-6, 8-13, 16-26 and 32-39 as described in the description; the same will apply hereinafter) and inventions relating to novel compounds (for example, compounds #7, 14, 15 and 27 to 31; the same will apply hereinafter).

Inventions as set forth in claims 6 to 21 are inventions relating to use of "ascofuranone; and ascofuranone homologs and ascochlorin homologs" based on a finding that the "ascofuranone; and ascofuranone homologs and ascochlorin homologs" as described in claim 1, 2 or 5 are "ligands of nuclear receptors PPAR's" and involve two concepts, namely, inventions relating to novel use of the publicly known compounds and inventions relating to use of compounds which are considered as novel compounds.

Invention as set forth in claim 22 is an invention relating to novel compounds per se which are Schiff bases of the above-described "ascofuranone; and ascofuranone homologs and ascochlorin homologs" as set forth in claim 1, 2, 3 or 4 with "amino group of serum protein" and different and independent from the above described "ascofuranone; and ascofuranone homologs and ascochlorin homologs". In addition, this invention is not an invention with the use of a finding that the above-described "ascofuranone; and ascofuranone homologs and ascochlorin homologs" are "ligands of nuclear receptors PPAR's".

Now, the relation among the concepts of the five groups of inventions as described above will be discussed. Inventions relating to novel compounds, among the compounds as cited in claims 1 to 5, and inventions wherein "ligands of nuclear receptors PPAR's" are novel compounds, among the inventions as set forth in claims 6 to 21, have a technical feature in common contributing to the prior art in the point of providing common novel compounds. Such being the case, these two groups of inventions are considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

However, it does not appear that there is a technical relationship between inventions relating to publicly known compounds, among the compounds as cited in claims 1 to 5, inventions wherein "ligands of nuclear receptors PPAR's" are publicly known compounds, among the inventions as set forth in claims 6 to 21, and invention as set forth in claim 22, and inventions as set forth in claims 1 to 21 wherein "ligands of nuclear receptors PPAR's" are novel compounds, involving one or more of the same or corresponding "special technical features (technical features clearly showing the contribution to the prior art made by the inventions as set forth in the claims as a whole)". Such being the case, these groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>i</sup> C07C59/92, C07C69/738, C07C403/20, C07C403/24, C07D213/79, C07D213/80, C07D307/32, C07D307/58, A61K31/12, A61K31/122, A61K31/192, A61K31/216, A61K31/341, A61K31/455, A61P3/10, A61P9/10, A61P9/12, A61P35/00, A61P37/00, A61P37/06, C07K14/765

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>i</sup> C07C59/92, C07C69/738, C07C403/20, C07C403/24, C07D213/79, C07D213/80, C07D307/32, C07D307/58, A61K31/12, A61K31/122, A61K31/192, A61K31/216, A61K31/341, A61K31/455, A61P3/10, A61P9/10, A61P9/12, A61P35/00, A61P37/00, A61P37/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP, 74628, A2 (CHUGAI SEIYAKU K. K) 23. 3月. 1983 (23. 03. 83), 要約, クレーム, 第1頁第13-21行, Example 17 & JP, 58-43938, A & JP, 58-69860, A & US, 4500544, A & US, 4542143, A & CA, 1192557, A & ZA, 8206528, A & AT, 20052, E & CS, 244911, B2 & CS, 245791, B2 & ES, 515648, A1 & ES, 522459, A1	1, 2, 4-9, 18-21
X	WO, 94/04520, A1 (株式会社イムノ・ジャパン (IMMUNO JAPAN INC.)) 3. 3月. 1994 (03. 03. 94), 要約, クレーム, 実施例1 (ファミリーなし)	1-3, 5-9, 18-21

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 05. 00

国際調査報告の発送日

06.06.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

井上 典之



4 C

9360

電話番号 03-3581-1101 内線 3450

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 94/05274, A1 (株式会社イムノ・ジャパン(IMMUNO JAPAN INC.)) 17. 3月. 1994(17. 03. 94), 要約, クレーム & JP, 6-305959, A	1, 2, 4-9, 18- 21
X	JP, 7-206838, A (株式会社イムノ・ジャパン(IMMUNO JAPAN INC.)) 8. 8月. 1995(08. 08. 95), 要約, クレーム (ファミリーなし)	1-3, 5-9, 18- 21
X	JP, 62-181271, A (財団法人 相模中央化学研究所(SAGAMI CHEMICAL RESEARCH CENTER)) 8. 8月. 1987(08. 08. 87), クレーム, 第1頁右下欄下から第8-6行 (ファミリーなし)	1-3, 5-7, 9, 18, 19, 21
X	JP, 51-110035, A (岡田正志) 29. 9月. 1976(29. 09. 76), クレーム, & AU, 7578668, A1	1, 2, 4, 5-7, 9, 18, 19, 21
X	JP, 51-36450, A (中外製薬株式会社(CHUGAI SEIYAKU K. K)) 27. 3月. 1976(27. 03. 76), クレーム, 第1頁右下欄第6行-第2頁左上 欄第11行 (ファミリーなし)	1-3, 5-7, 9, 18, 19, 21
X	US, 5420334, A (MERCK & CO., INC.) 30. 5月. 1995(30. 05. 95), 要約, クレーム14 & GB, 2288173, A1	1, 2, 4, 5-7, 9, 18, 19, 21
X	GB, 1498334, A (岡田正志) 18. 1月. 1978(18. 01. 78), 第1頁第5-21行 (ファミリーなし)	1-3, 5-7, 9, 18, 19, 21
X	GB, 1495353, A (CHUGAI SEIYAKU K. K) 14. 12月. 1977(14. 12. 77), 第1頁第6-12行, クレーム & DE, 2515142, A1 & US, 3995061, A & CA, 1057306, A1 & NL, 7504079, A & FR, 2267094, A1	1, 2, 4, 5-7, 9, 18, 19, 21
X	US, 3546073, A (AMERICAN CYANAMID CO.) 8. 12月. 1970(08. 12. 70), 要約, 第2欄第33-40行, 式(VIII) (ファミリーなし)	1, 2, 4, 5-7, 9, 18, 19, 21
Y	WO, 99/07357, A1 (小野薬品工業株式会社(ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.)) 18. 2月. 1999(18. 02. 99), 要約, 第2頁7行-第4頁第6行 & AU, 9885595, A1	1-9, 18-21

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 98/57631, A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 23. 12月. 1998 (23. 12. 98), 要約, 第2頁第2行-第3頁第8行 & US, 5925657, A & AU, 9881471, A1	1-9, 18-21
Y	WO, 98/43081, A1 (LIGAND PHARMACEUTICALS INCORPORATED) 1. 10月. 1998 (01. 10. 98), 要約, 第2頁第4-7, 21-29行, 第6頁第4行- 第7頁第10行 & AU, 9867735, A1	1-9, 18-21
Y	NATURE (LONDON), Vol. 391, No. 6662, (1998) Mercedes Ricote et al "The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ is a negative regulator of macrophage activation" pp. 79-82 この出願の明細書中で引用	1-9, 18-21
Y	NATURE (LONDON), Vol. 391, No. 6662, (1998) Chengyu Jiang et al "PPAR- $\gamma$ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines" pp. 82-86 この出願の明細書中で引用	1-9, 18-21
Y	内分泌・糖尿病科, Vol. 6, No. 6, (1998) SUGIYAMA Takuya et al, "Insulin sensitivity and retinoid X receptor", pp. 551-557 Chemical Abstracts, Vol. 130, 要約No. 10218 を参照	1-9, 18-21

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 10-17 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲10-17に記載のものは、「治療による人体の処置方法」に該当する (PCT規則39.1(iv))。

2. ☐ 請求の範囲 1, 6-22 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

(特別ページを参照。)

3. ☐ 請求の範囲                      は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

(特別ページを参照。)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-9, 18-21

(なお、請求の範囲10-17は、第Ⅰ欄1.に記載したように、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。)

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## 第 I 欄 2. の続き

請求の範囲 1 に記載の「アスコフラノン同族体又はアスコクロリン同族体であって、少なくともオルシラルデヒド部分を有し、該オルシラルデヒド部分の 2 位及び／又は 4 位の水酸基の水素が、 $-(C_1 \sim C_{15})$  アルキル若しくはアルケニル、……又はイソニコチノイルからなる群より選択される基により置換されている前記同族体」なるものは、請求の範囲 2-4 に記載の式で表される化合物の他に、どのような化合物までを包含するものであるのか不明瞭である。

そのため、請求の範囲 1 に記載された発明、及び、請求の範囲 1 を引用する請求の範囲 6-22 に記載された発明が不明瞭である。

請求の範囲 6, 10, 14 に記載されている「核内リセプター PPAR リガンド依存性の遺伝情報の転写の制御により改善される疾患又は状態」なるものは、請求の範囲 7, 11, 15 に列記されている疾患・状態及び明細書において具体的に開示されている疾患・状態の他に、どのような疾患・状態までを包含するものであるのか不明瞭である。

なお、請求の範囲 1, 6-9, 18-22 については、請求の範囲 2-4 に記載の式で表される化合物に基づいて、また、請求の範囲 6, 14 については、請求の範囲 7, 15 に列記されている疾患・状態及び明細書において具体的に開示されている疾患・状態に基づいて、国際調査を行った。



## 第Ⅱ欄 の続き

次に述べるように、この国際出願には4つの発明があると、この国際調査機関は認めた。

- ・請求の範囲1-21に記載の発明のうち、「核内リセプターPPARのリガンド」が新規化合物である発明
- ・請求の範囲1-5に記載の化合物のうち、公知の化合物に関するもの
- ・請求の範囲6-21に記載の発明のうち、「核内リセプターPPARのリガンド」が公知化合物である発明
- ・請求の範囲22に記載の発明

請求の範囲1-5に記載の発明は、「核内リセプターPPARのリガンド」としての性質を有する「アスコフラノン；並びにアスコフラノン同族体又はアスコクロリン同族体」という化合物自体に関する発明であり、この発明には、公知の化合物（例えば、明細書に記載の化合物#1-6, 8-13, 16-26, 32-39、以下同じ）に関するものと、新規化合物とされる化合物（例えば、同化合物#7, 14, 15, 27-31、以下同じ）に関する発明という2つの概念が含まれている。

請求の範囲6-21に記載の発明は、請求の範囲1, 2又は5に記載の上記「アスコフラノン；並びにアスコフラノン同族体又はアスコクロリン同族体」が「核内リセプターPPARのリガンド」であるという知見に基づいた、「アスコフラノン；並びにアスコフラノン同族体又はアスコクロリン同族体」の用途に関する発明であり、この発明には、公知の化合物の新たな用途に関する発明と、新規化合物とされる化合物の用途に関する発明という2つの概念が含まれている。

請求の範囲22に記載の発明は、請求の範囲1, 2, 3又は4に記載の上記「アスコフラノン；並びにアスコフラノン同族体又はアスコクロリン同族体」と「血清タンパク質のアミノ基」とのシッフ塩基という、上記「アスコフラノン；並びにアスコフラノン同族体又はアスコクロリン同族体」とは別な独立の化合物自体に関する発明であり、しかも、上記「アスコフラノン；並びにアスコフラノン同族体又はアスコクロリン同族体」が「核内リセプターPPARのリガンド」であるという知見を利用した発明でもない。

ここで、上記5つの一群の発明概念の関係について検討すると、請求の範囲1-5に記載の化合物のうち新規化合物に関するものと、請求の範囲6-21に記載の発明のうち「核内リセプターPPARのリガンド」が新規化合物であるものについては、共通の新規化合物を提供するという点において、先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴を共有しており、単一の一般的発明概念を形成するように関連していると認められる。

しかしながら、請求の範囲1-5に記載の化合物のうち公知の化合物に関するものと、請求の範囲6-21に記載の発明のうち「核内リセプターPPARのリガンド」が公知の化合物である発明と、請求の範囲22に記載の発明については、請求の範囲1-21に記載の発明のうち「核内リセプターPPARのリガンド」が新規化合物である発明と、それぞれ同一又は対応する「特別な技術的特徴（請求の範囲に記載された各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴）」を含む技術的な関係があるとは認められず、単一の一般的発明概念を形成するように関連しているとは認められない。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**